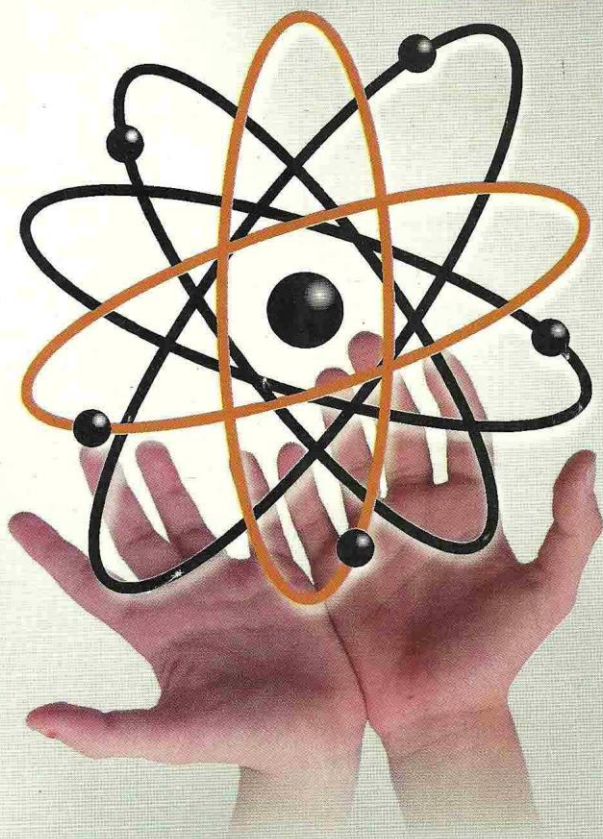


QUÍMICA DE ALIMENTOS

TEORIA E PRÁTICA

4ª edição



SUMÁRIO

Capítulo 1 - Oxidação de Lipídios em Alimentos, 15

Introdução, 15
Ácidos graxos, 16
Triacilglicerol, 17
Reações de oxidação, 22
Fatores que aceleram a oxidação, 24
Alterações químicas, 26
Mecanismo da auto-oxidação, 28
Auto-oxidação do ácido oléico, 31
Auto-oxidação do ácido linoléico, 31
Auto-oxidação do ácido linolênico, 33
Mecanismo da fotoxidação, 34
Degradação de peróxido, 39
Formação de aldeídos, 43
Formação de álcool e hidrocarboneto, 49
Mecanismo enzimático: lipoxigenase, 50
Mecanismo de ação enzimática, 54
Rancidez hidrolítica, 59
Espécies reativas oriundas do oxigênio (ErO_2), 62
Reação das espécies reativas com os componentes do alimento, 66
Oxidação de lipídios durante o processamento, 74
Óleo/gordura, 76
Hidrogenação, 85
Carne, 88
Peixe, 91
Leite e derivados, 93
Cereais e derivados, 96
Frutas e vegetais, 97
Produtos desidratados, 98
Extração do óleo de soja e subprodutos, 100
Índice de peróxido: determinação e quantificação, 101
Deteção de aldeídos: teste de Kreis, 105
Determinação de ácidos graxos livres, 107

Determinação do índice de saponificação, 111

Determinação do índice de iodo, 114

Índice de TBA – ácido tiobarbitúrico, 117

Referências, 122

Capítulo 2 - Antioxidantes, 124

Introdução, 124

Controle da auto-oxidação, 125

Escolha do antioxidante, 126

Classificação dos antioxidantes, 127

Antioxidantes primários, 128

Mecanismo de ação, 129

Antioxidantes sinérgicos, 131

Característica dos antioxidantes primários, 132

Característica dos antioxidantes sinérgicos, 144

Ácido ascórbico, 144

Palmitato de ascorbila, 145

Ácido eritórbito, 146

Agentes complexantes, 147

Ácido fosfórico e fosfatos, 148

Ácido etilenodiamina tetracético (EDTA), 150

Ácido cítrico, 151

Incorporação de antioxidantes em alimentos, 152

Antioxidantes: detecção e quantificação, 154

Referências, 160

Capítulo 3 - Conseqüências Biológicas da Oxidação de Lipídios, 161

Introdução, 161

Formação de radicais livres no organismo, 163

Remoção de radicais livres no organismo, 168

Metabolismo do oxigênio, 176

Mecanismo de proteção, 180

Formação de oxigênio radical, 185

Reatividade do íon superóxido, 186

Antioxidantes, 188

Ácido linoléico conjugado, 192

Auto-oxidação do colesterol, 195

Proteção do LDL por antioxidante, 202

Colesterol no processamento de alimentos, 205
Determinação de compostos fenólicos, 208
Referências, 209

Capítulo 4 - Emulsão/Emulsificantes, 211

Introdução, 211
Complexidade da emulsão, 213
Ação do emulsificante, 218
Cargas das gotículas, 220
Interações moleculares, 220
Classificação dos emulsificantes, 226
Balanço hidrofílico lipofílico (BHL), 228
Emulsificantes para alimentos, 231
Monoglicerídios, 234
Derivados de monoglicerídios, 235
Derivados de ácidos graxos e alcoóis, 238
Lecitina, 241
Modificações químicas e enzimáticas da lecitina, 242
Emulsificantes poliméricos, 245
Proteína, 250
Polissacarídios, 253
Emulsificação, 254
Inversão de fases, 257
Oxidação da emulsão, 259
Fatores que influenciam a oxidação de lipídios em emulsão, 260
Interação do emulsificante com proteínas e amido, 266
Determinação do tipo de emulsão, 269
Referências, 272

Capítulo 5 - Óleos Essenciais, 273

Introdução, 273
Extração de óleos essenciais, 273
Características dos óleos essenciais, 276
Extração, cromatografia e determinação de aldeídos, 282
Determinação do teor de aldeído no óleo essencial, 283
Referências, 284

Capítulo 6 - Toxicantes Naturais, 286

Introdução, 286
Inibidores de proteases, 287
Glicosídeos cianogênicos, 288

Glicosinolatos, 290
Glicoalcalóides, 291
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), 293
Fatores antinutricionais, 295
Ácido fítico, 296
Ascorbato oxidase, 299
Lipoxigenase e peroxidases, 299
Glicoalcalóides: extração e detecção, 299
Referências, 300

Capítulo 7 - Aflatoxinas, 302

Introdução, 302
Estrutura química, 302
Importância, 304
Metabolismo da aflatoxina-B₁, 304
Interação aflatoxina-ácidos nucleicos, 307
Interação aflatoxina-proteínas, 309
Estabilidade das aflatoxinas, 310
Controle, 313
Aflatoxinas: extração, purificação e separação, 314
Referências, 316

Capítulo 8 - Conservantes Químicos, 317

Introdução, 317
Tratamento térmico, 318
Seleção de conservantes para alimentos, 321
Aplicação dos conservantes químicos, 322
Mecanismo de inibição dos ácidos e derivados, 322
Acidulantes, 323
Ácido benzóico e derivados, 324
Ácido propiônico e derivados, 325
Ácido sórbico e derivados, 325
Ésteres do ácido p-hidroxibenzoico (parabéns), 326
Fumaça, 327
Gases, 327
Epóxidos, 327
Sulfito, 329
Nitrato/nitrito, 333
Atividade antimicrobiológica, 335
Nitrosaminas em produtos curados e seu controle, 326

Metabolismo das nitrosaminas, 340
Sulfito: determinação e quantificação, 340
Referências, 34

Capítulo 9 – Proteína, 345

Introdução, 345
Classificação dos aminoácidos, 349
Aminoácidos polares, 350
Alterações da proteína no processamento de alimento, 351
Desnaturação, 352
Alteração da solubilidade, 353
Mudança da força iônica, 356
Mudanças no pH, 359
Tratamento alcalino, 362
Racemização, 364
Ligações cruzadas, 365
Adição de solventes orgânicos miscíveis, 368
Tratamento térmico, 370
Propriedades funcionais de proteínas, 373
Reações da proteína e aminoácidos com as espécies reativas oriundas do oxigênio (ERO_2), 374
Interação da proteína com lipídio, 379
Extração, determinação do PI e solubilidade, 383
Efeito do aquecimento sobre as proteínas, 386
Efeito do pH na hidratação de proteínas, 386
Referências, 388

Capítulo 10 - Escurecimento Enzimático, 389

Introdução, 389
Mecanismo da ação enzimática, 391
Métodos de controle, 393
Aplicação do calor, 395
Aplicação do dióxido de enxofre e sulfito, 396
Escurecimento de frutas/vegetais, 398
Alternativas para o sulfito no processamento de alimentos, 400
Frutas e vegetais minimamente processados, 401
Aplicação de ácidos, 405
Remoção do oxigênio, 407
Utilização da vitamina C em processamento de alimentos, 407
PPO: atividade e controle, 408
Referências, 412

Capítulo 11 - Escurecimento Não-Enzimático, 413

- Introdução, 413
- Reação de Maillard, 414
- Efeito da temperatura, 416
- Efeito do pH, 416
- Tipos de amina presentes, 417
- Tipo de açúcares presentes, 417
- Teor de umidade, 417
- Sulfito, 418
- Oxidação da vitamina C, 418
- Reação de caramelização, 422
- Reações de escurecimento em alimentos, 423
- Escurecimento não-enzimático: reação e controle, 432
- Referências, 434

Capítulo 12 - Enzimas: Catalase e Peroxidase, 435

- Introdução, 435
- Atividade enzimática, 435
- Controle, 437
- Catalase e peroxidase: atividade e controle, 439
- Referências, 442

Capítulo 13 - Corantes Naturais, 443

- Introdução, 443
- Urucum, 444
- Açafrão, 446
- Extrato de beterraba, 447
- Pimentão-vermelho, 449
- Cochonila/carmim, 451
- Extrato da casca de uva, 452
- Caramelo, 457
- Extração de pigmentos: beterraba e uva, 458
- Referências, 462

Capítulo 14 - Isoflavonóides, 464

- Introdução, 464
- Química dos isoflavonóides, 465
- Propriedades biológicas das isoflavonas, 469
- Estrógenos: mecanismo de ação, 470
- Atividade estrogênica e antiestrogênica, 471

Metabolismo das isoflavonas, 472
Isoflavonóides e hipercolesterolemia, 476
Isoflavonóides e câncer, 477
Isoflavonóides como antioxidantes, 478
Efeito do processamento, 479
Análise e extração, 483
Cromatografia líquida de alto desempenho (CLAD), 485
Cromatografia de fase gasosa, 487
Referências, 489

Capítulo 15 - Cromatografia de Fase Gasosa, 492

Introdução, 492
Instrumentação básica, 493
Mecanismo de separação, 493
Coluna e fase estacionária, 495
Injeção da amostra, 498
Teoria em cromatografia, 499
Hetp, 501
Resolução, 501
Detectores, 504
Identificação e quantificação dos picos, 505
Interpretação do cromatograma, 506
Separação, identificação e quantificação do α -tocoferol, 513
Separação, identificação e quantificação de ácidos graxos, 513
Determinação de etanol em vinho, 514
Identificação e quantificação de alcoóis superiores em aguardente de cana, 515
Referências, 521

Capítulo 16 - Cromatografia Líquida de Alto

Desempenho, 522

Introdução, 522
Instrumentação básica, 524
Coluna e fase estacionária, 524
Cromatografia sólido-líquido (adsorção), 528
Cromatografia líquido-líquido (partição), 529
Cromatografia de fase normal (adsorção e partição), 530
Cromatografia sólido-líquido de fase reversa, 531
Cromatografia líquida de troca iônica, 532
Exclusão molecular, 535

OXIDAÇÃO DE LIPÍDIOS EM ALIMENTOS

Introdução

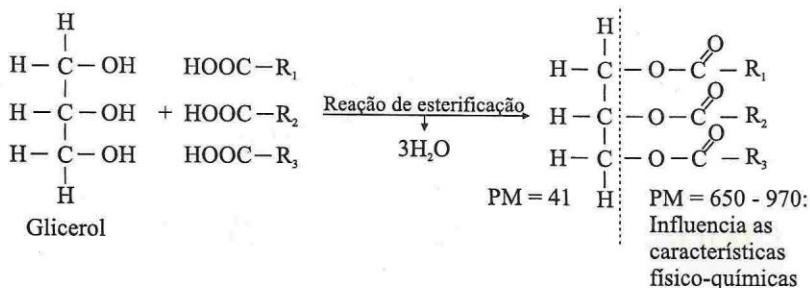
Óleos e gorduras são partes de um grupo de compostos denominados lipídios, sendo os triacilgliceróis os tipos de lipídios mais comuns em alimentos. É passível de diversas alterações químicas durante o processamento, armazenamento e consumo do alimento, gerando substâncias desejáveis ou não ao *flavor*. O controle dessas reações requer o conhecimento da química dos lipídios.

Os lipídios, particularmente óleos e gorduras, constituem os principais componentes dos alimentos insolúveis em água. Em contraste com proteínas e carboidratos, óleos e gorduras possuem poucos sítios reativos na molécula, de modo que a ocorrência de reações durante o processamento e armazenamento do alimento é menos variada que a de componentes solúveis em água.

Os lipídios ocorrem em quase todos os tipos de alimentos, e a maioria deles (~ 90%) é encontrada na forma de triacilgliceróis. Os ácidos graxos naturais presentes nos alimentos possuem cadeia linear e números pares de carbono, os quais podem ser saturados ou insaturados com até seis duplas ligações. Além dos triglicerídios, os alimentos também possuem outros tipos de lipídios, como *fosfolipídios*, *glicolipídios*, *esfingolipídios* e *lipoproteínas*.

Quimicamente, os triacilgliceróis são ésteres de glicerol contendo três ácidos graxos. (eq. 1.1) Cada ácido graxo pode conter diferentes números de átomos de carbono e diferentes graus de insaturação. A existência de vários tipos e a possibilidade de serem alocados em diferentes posições na estrutura do glicerol significam que pode haver um grande número de moléculas possíveis de triacilglicerol no alimento.

eq. 1.1



Os efeitos da oxidação afetam a maioria dos componentes no alimento, incluindo os micros nutrientes (cor, *flavor*, vitaminas e minerais). Os macroconstituintes (carboidratos, lipídios e proteínas) também são sensíveis à oxidação. O branqueamento dos pigmentos, destruição de vitaminas, formação de *flavor* desagradável e ligações cruzadas (textura) são resultados bem conhecidos da oxidação em alimentos.

Ácidos graxos

Ocorrem como componentes dos lipídios nas membranas (fosfolipídios e glicolipídios), triacilglicerol em óleos vegetais e peixes, e no tecido adiposo em animais. Os ácidos graxos de ocorrência natural são agrupados em dois tipos: *saturados* e *insaturados* (Tabela 1.1). Ambos possuem um grupamento carboxílico na extremidade polar e uma cadeia de hidrocarbonetos na cauda apolar ($\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_x - \text{COOH}$). São compostos anfipáticos, pois o grupamento carboxílico é hidrofílico e a cauda de hidrocarboneto é hidrofóbica. O grupamento carboxílico pode-se ionizar em condições adequadas.

Os ácidos graxos saturados presentes em organismos vivos normalmente possuem um número par de átomos de carbono e a cadeia de hidrocarbonetos não é ramificada possuindo baixa reatividade. São subdivididos em *cadeia curta* (C_4 a C_{10}), *média* (C_{12} a C_{14}), *longa* (C_{16} a C_{22}) e *muito longa* ($> \text{C}_{22}$). Existindo ligações duplas entre os átomos de carbono na cadeia, o ácido graxo é insaturado, podendo ser *conjugado* quando a insaturação alterna com a ligação simples ($-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}-$) ou *não-conjugado* quando a ligação dupla é separada por um ou mais átomos de carbono contendo ligações simples ($-\text{C}=\text{C}-\text{C}_n-\text{C}=\text{C}-$), possuem alta reatividade.

Os ácidos graxos podem apresentar uma ou mais insaturação, sendo separados em *monoinsaturados* ou *polinsaturados*, e ainda pode apresentar duas configurações possíveis, *cis* ou *trans*, dependendo da posição dos grupos alquila. Embora a maioria das fontes naturais de gorduras insaturadas ocorra na configuração *cis*, ácidos graxos *trans* também ocorre em alimentos.

Pequenas quantidades de ácidos graxos *trans* ocorre naturalmente em leite de ruminantes em razão da hidrogenação resultante da fermentação anaeróbica no rúmen (Tabela 1.17). Em manteiga, são encontrados baixos níveis (~3%), e por comparação, óleos vegetais hidrogenados possuem de 30 a 40% de ácidos graxos *trans*.

Aspectos significantes em lipídios é o seu conteúdo de diferentes tipos de ácidos graxos: saturados, monoinsaturados e polinsaturados. Todos os óleos/gorduras possuem uma mistura complexa de todos os três tipos de ácidos graxos. Portanto, é incorreto descrever o óleo/gordura como saturado ou insaturado, pois somente seus ácidos graxos constituintes podem ser assim descrito. Por exemplo, a gordura de porco é freqüentemente classificada como saturada, muito embora em torno de 60% dos ácidos graxos constituintes sejam insaturados (Tabela 1.2). De forma similar entre os óleos vegetais, o óleo de palma é freqüentemente classificado como saturado, muito embora 50% de seus ácidos graxos sejam insaturados.

Triacilglicerol

Os ácidos graxos ocorrem em alimentos principalmente na forma de ésteres com o álcool glicerol (eq. 1). Os ésteres predominantes são os triacilgliceróis, acompanhados de quantidades menores de mono-, diacilgliceróis e ácidos graxos. O glicerol é um composto simples que contém três grupamentos hidroxila. Quando os três grupamentos álcool formarem ligações éster com ácidos graxos, o composto resultante será um triacilglicerol. Observe que os três grupos éster estão na parte polar da molécula, ao passo que a cauda dos ácidos graxos é apolar. É comum que três ácidos graxos diferentes estejam esterificados ao grupamento álcool da mesma molécula do glicerol. Os triacilgliceróis não são componentes das membranas, sendo acumulado no tecido adiposo e constitui um meio de armazenamento de ácidos graxos.

Tabela 1.1 - Ácidos graxos: nome trivial e sistemático

	NOME TRIVIAL	NOME SISTEMÁTICO	FÓRMULA	PF (°C)
Saturado				
C4:0	Ac. butírico	Ac. butanóico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$	-7,9
C6:0	Ac. capríico	Ac. hexanóico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$	-3,4
C8:0	Ac. caprílico	Ac. octanóico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_6-\text{COOH}$	16,3
C10:0	Ac. cáprico	Ac. decanóico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_8-\text{COOH}$	31,2
C12:0	Ac. láurico	Ac. dodecanóico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{COOH}$	44
C14:0	Ac. mirístico	Ac. tetradecanóico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{COOH}$	54,1
C16:0	Ac. palmítico	Ac. hexadecanóico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$	69,9
C18:0	Ac. esteárico	Ac. octadecanóico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{16}-\text{COOH}$	70
C20:0	Ac. araquídico	Ac. eicosanóico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{18}-\text{COOH}$	75,5
C22:0	Ac. behênico	Ac. docosanóico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{20}-\text{COOH}$	79,9
C24:0	Ac. lignocérico	Ac. tetradecanóico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{22}-\text{COOH}$	84
Monoinsaturado				
C10:1	Ac. caproléico	Cis-9-ác. decenóico	$\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	
C12:1	Ac. lauroléico	Cis-9-ác. dodecenóico	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	
C14:1	Ac. miristoléico	Cis-9-ác. tetradecenóico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	
C16:1	Ac. palmitoléico	Cis-9-ác. hexadecenóico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	0,5
C18:1	Ac. oléico	Cis-9-ác. octadecenóico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	14
C20:1	Ac. gadoléico	Cis-9-ác. eicosenóico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_9-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	
C22:1	Ac. erúico	Cis-13-ác. docosenóico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{COOH}$	35

Continua...

Tabela 1.2 - Composição aproximada (%) dos principais ácidos graxos em óleos e gorduras

	VEGETAL	C4:0 (BUTÍRICO)	C6:0 (CAPRÓICO)	C8:0 (CAPRÍLICO)	C10:0 (CÁPRICO)	C12:0 (LÁURICO)	C14:0 (MIRÍSTICO)	C14:1 (MIRISTOLÉICO)	C16:0 (PALMÍTICO)	C16:1 (PALMITOLÉICO)	C18:0 (ESTEÁRICO)	C18:1 (OLÉICO)	C18:2 (LINOLÉICO)	C18:3 (LINOLÊNICO)	C20:0 (ARAQUÍDICO)	C20:1 (GADOLÉICO)	C20:4 (ARAQUIDÔNICO)	C22:0 (BEHÊNICO)	C24:0 (LIGNOCÉRICO)	ÍNDICE DE IODO	ÍNDICE DE SAPONIFICAÇÃO
SOJA							T		11	T	4	24	54	8	0,3	T		T		125-138	188-195
MILHO									12	T	2	28	57	1	T	T				110-128	186-196
GIRASSOL						0,5	T		7	T	5	19	68	0,5	0,4					122-139	186-196
CANOLA									4	T	2	64	18	9	0,6	1		T	T	110-115	173-181
ALGODÃO							1		25	0,7	2	18	53	0,3	T					99-121	189-199
COCO		0,5	8	7	49		18		8,5		2,5	6,5	32		T		T			7-13	248-264
AMENDOIM							T		12	T	3	47	71	10	1,5	1,4		3	1	84-102	188-196
OLIVA									14	1,2	2,5	71	10	0,6	1,0					76-90	188-196
BABASSU		0,5	5,3	6	44	16			9		3	15	2		T					13-18	247-254
CACAU							T		26	0,3	35	35	3		1					32-40	190-200
PALMA						0,3	1		45	T	5	39	9,5	0,3						45-56	195-205

Continua...

Tabela 1.2 - Cont.

	C4:0 (BUTÍRICO)	C6:0 (CAPRÓICO)	C8:0 (CAPRÍLICO)	C10:0 (CÁPRICO)	C12:0 (LÁURICO)	C14:0 (MIRÍSTICO)	C14:1 (MIRISTOLÉICO)	C16:0 (PALMÍTICO)	C16:1 (PALMITOLÉICO)	C18:0 (ESTEARÍCO)	C18:1 (OLÉICO)	C18:2 (LINOLÉICO)	C18:3 (LINOLÊNICO)	C20:0 (ARAQUÍDICO)	C20:1 (GADOLÉICO)	C20:4 (ARAQUIDÔNICO)	C22:0 (BEHÊNICO)	C24:0 (LIGNOCÉRICO)	ÍNDICE DE IODO	ÍNDICE DE SAPONIFICAÇÃO
ARROZ			T	T	0,5	0,5		17	0,3	2	44	34	1	0,5	0,5		T	T	92-109	181-195
CAFÉ (12%)					2			30		4,5	19	44		1,5						
ABACATE (16%)								9	2	0,5	78	8,5	1							
CASTANHA (65%)								14		0,3	8,6	29	47	0,3						
TRIGO						T		19	1	0,5	17	57	5							
ANIMAL																				
MANTEIGA	4	2,5	1	2	3	12	1	26	2	13	28	3	T		T				25-42	210-240
PORCO				T	T	1,5		25	3	12	45	10	1	T	1,5	0,5			53-68	192-203
SEBO				T	T	3,5	T	26	3,5		39	2	0,6	T	0,4				33-50	190-202
FRANGO					T	1		23	6		39	21	1						76-80	194-204
BOI				0,5	0,3	4		28	6		43	2	2						32-47	190-200
OVO (11%)						T		27	4		44	13,4	0,3	1						

T (traços) < 0,2%.

Mamona: (48%): (16:0 = 1%), (18:1 = 3%), (18:2 = 4%) e (18:1 - 12OH > 90%)

(CH₃ - (CH₂)₅ - CH - CH₂ - CH = CH - (CH₂)₇ - COOH - Ricinoléfico (18:1 - 12OH)

Reações de oxidação

As reações de oxidação em lipídios estão entre as mais frequentes em alimentos. São causados pelo oxigênio atmosférico, menos frequentemente pelo ozônio, peróxido, metais e outros agentes oxidantes (Apêndice 1). As reações de oxidação ocorrem quando elétrons são removidos de um átomo ou grupos de átomos, e para cada reação de oxidação há uma reação de redução correspondente envolvendo a adição de elétrons a um átomo ou grupos de átomos.

As reações de oxirredução são comuns em sistemas biológicos, sendo algumas benéficas para o alimento, enquanto outras possuem efeito detrimental, incluindo a degradação oxidativa de vitaminas, pigmentos e ácidos graxos essenciais, com conseqüente perda de valor nutritivo, além do desenvolvimento de sabor e odor desagradáveis (Figura 1.1).

A oxidação dá-se por meio da perda de elétrons durante a transferência destes de uma substância a outra, um de cada vez ou em pares. Por exemplo, em uma reação química na qual determinada substância é oxidada pela transferência de dois elétrons, formando um produto final estável, a oxidação pode ocorrer unicamente em um estágio, durante o qual ambos os elétrons são transferidos, ou em dois estágios, pela transferência de um de cada vez, com formação intermediária de um radical livre. Se esta forma intermediária é instável, rapidamente se perde o segundo elétron, formando um produto final estável, o que conseqüentemente ocorreria apenas em concentração extremamente baixa e de difícil detecção. A oxidação de lipídios é um exemplo típico de reação envolvendo a formação de radicais livres.

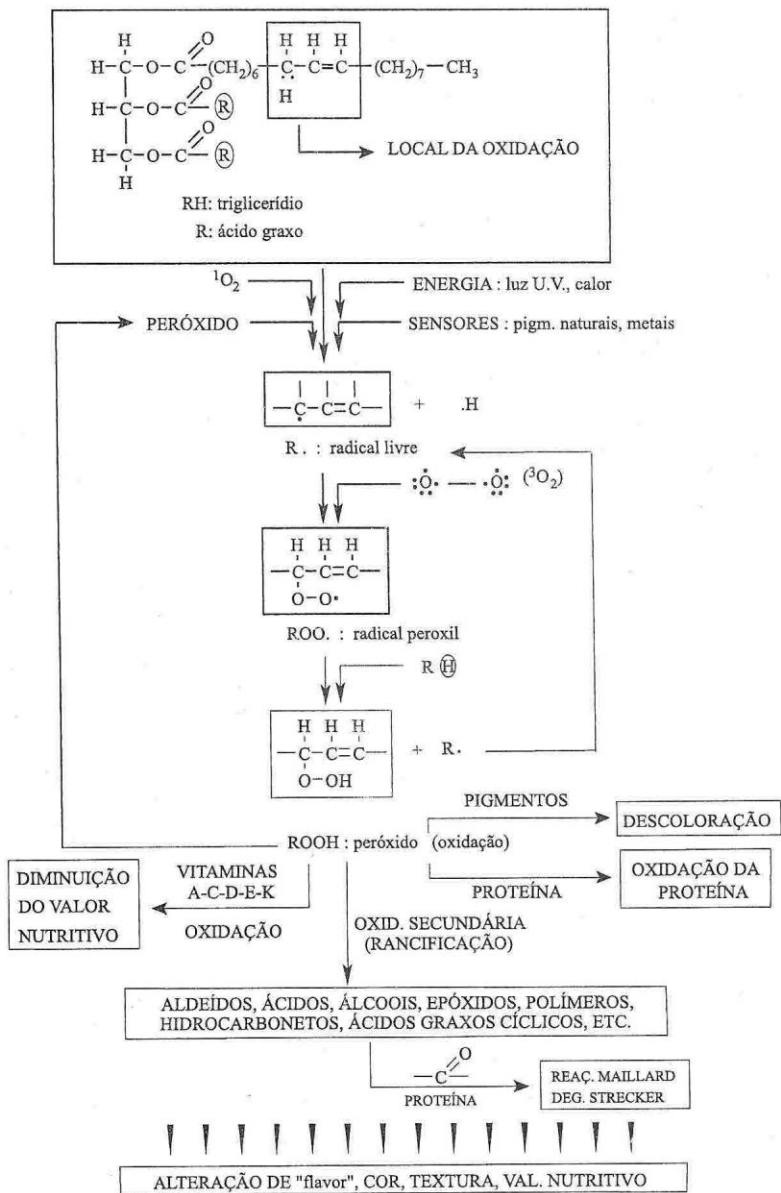


Figura 1.1 - Alterações químicas no alimento, provocadas pela oxidação de lipídios durante o processamento e armazenamento.

Fatores Que Aceleraram a Oxidação

As reações de oxidação podem ser influenciadas por diversos fatores, como calor, luz, reações de ionização, traços de metais (cobre e ferro), pelas metaloproteínas e pela lipoxigenase.

- 1 – *Composição de ácidos graxos*: o número, posição e a geometria das insaturações afetam a velocidade da oxidação. Para o araquidônico, linolênico, linoléico e oléico a velocidade da oxidação são aproximadamente 40:20:10:1, respectivamente. Ácido graxo *cis* oxida mais rapidamente que o seu isômero *trans*, e as ligações conjugadas são mais reativas que a não-conjugada (p. 17).
- 2 – *Ácido graxo livre e correspondente acilglicerol*: os ácidos graxos oxidam mais rápido quando livres que na forma esterificado. A velocidade da reação de oxidação depende do grau de insaturação na molécula do ácido graxo. Assim, quanto maior o grau de insaturação do óleo e, ou, da gordura, maior será a suscetibilidade à oxidação. Por exemplo, óleo de soja é muito menos estável que gordura de coco (Tabela 1.2).
- 3 – *Concentração de oxigênio*: A solubilidade do oxigênio é maior em óleo que na água. Quando o oxigênio é abundante, a velocidade da oxidação é independente de sua concentração, mas em concentração muita baixa a velocidade é aproximadamente proporcional à sua concentração. O oxigênio na atmosfera (21%) coexiste com 75% de nitrogênio. Um litro de água, por exemplo, contém aproximadamente 8,0 mg de oxigênio, o equivalente a 0,25 mM. Portanto, a maioria dos alimentos *in natura* (80 – 90% de água) não tem mais que 8 ppm de oxigênio. A solubilidade do oxigênio é elevada em óleos comparada com meio aquoso.
- 4 – *Umidade*: depende da atividade da água (a_w). Em alimentos secos com baixo teor de umidade ($a_w < 0,1$), a oxidação ocorre rapidamente. Aumentando o a_w para 0,3 retarda a oxidação de lipídios. Este efeito protetor da pequena quantidade de água está relacionado pela redução da atividade de catalisadores metálicos, pelo amortecimento de radicais livres, e, ou, impedindo o acesso do oxigênio ao lipídio. Valores elevados de $a_w = 0,55 - 0,85$ a velocidade da oxidação aumenta novamente, provavelmente em razão do aumento da mobilização de catalisadores e do oxigênio (Figura 1.28).

5 – *Tratamento térmico*: A maioria das reações químicas aumenta com a elevação da temperatura e, portanto, com o tratamento térmico. Os processos que utilizam temperaturas elevadas como a pasteurização e esterilização aceleram a velocidade da reação. A refrigeração e/ou congelamento não paralisa a oxidação devido à solubilidade do oxigênio em solução aquosa aumentar em baixa temperatura.

As reações de oxidação induzidas termicamente podem ocorrer tanto em lipídios saturados como em insaturados, em temperaturas utilizadas nos processos de frituras. Os ácidos graxos saturados são estáveis em temperaturas utilizadas em operação de enlatamento, mas nos insaturados ocorrem reações de deterioração na presença do oxigênio e calor, com formação de grande número de substâncias voláteis com sabor e odor desejáveis e indesejáveis.

6 – *Lipoxigenase*: O peróxido pode também ser formado por via alternativa, pela reação de ácidos graxos polinsaturados (linoléico, linolênico e araquidônico) com o oxigênio catalisado pela enzima lipoxigenase presente em vegetais. Os radicais livres intermediários formados durante a oxidação catalisada pela enzima podem oxidar compostos como carotenóides e polifenóis, levando à descoloração do produto (Figura 1.10).

7 – *Metais (ferro e cobre)*: Íons metálicos de transição são eficientes promotores das reações de formação de radicais livres, em razão da transferência de elétron que ocorre durante a alteração do seu estado de oxidação. Atuam de duas formas: na redução da energia de ativação da reação inicial da oxidação e na decomposição de peróxidos. O rompimento homolítico da fraca ligação O–O dos peróxidos resulta na formação de radicais livres responsáveis pela reação em cadeia (eq. 1.11). Quantidades traços de metais são normalmente encontrados em alimentos (endógenos: livres e ligados) ou oriundos de equipamentos utilizados no processamento e armazenamento.

A ruptura homolítica espontânea em alimentos é insignificante, exceto quando estes são aquecidos durante processamento térmico. Na presença de metais, a decomposição catalítica de peróxidos é a principal fonte de radicais livres.

8 – *Metaloproteínas*: A oxidação de lipídios ocorre na presença de catalisadores, como as hemoproteínas, da mesma forma que a luz e o

calor. A reação envolvendo hemoglobina e oxigênio produz oxigênio singlete, responsável pela oxidação; o estado de oxidação do metal é fundamental no desenvolvimento da reação. O aquecimento da carne a 110 °C, por exemplo, destrói a estrutura heme, promovendo rápido desenvolvimento da rancidez. De 2 a 4% do total da gordura é encontrado na forma de fosfolipídios altamente insaturados, sendo responsável pelo desenvolvimento da rancidez, devido à sua proximidade do grupo heme da mitocôndria. Os pigmentos da carne, os quais atuam como potentes catalisadores, em contato com os lipídios, na carne moída, aceleram o processo oxidativo em velocidade maior que em músculo intacto.

Alterações Químicas

Em alimentos *in natura* e, ou, processados, o oxigênio é o principal agente capaz de provocar alterações como rancidez oxidativa e descoloração de carnes, frutas e vegetais. A oxidação dos constituintes do alimento (lipídios, vitaminas, sabor e aroma) é o principal problema que afeta em todos os aspectos a qualidade do produto (Figura 1.1).

As duas alterações químicas mais importantes que ocorrem naturalmente em óleos/gorduras são as *oxidações* e as *lipólises*. A lipólise é o processo de hidrólise da ligação éster por certas enzimas (lipases) ou pela combinação do calor e da umidade, que tem como resultado a liberação de ácidos graxos, que pode ser desejável ou não à qualidade do produto. A lipólise é indesejável a alguns produtos pela formação de *flavor* e odor estranho (rancidez hidrolítica). No entanto, quantidade limitada de lipólise é benéfica à qualidade de alguns produtos (queijo, iogurte) pela formação de sabor e odor desejáveis.

A oxidação de lipídios é uma das mais importantes causas da deterioração da qualidade dos alimentos, devido à formação de sabores e odores indesejáveis (rancidez oxidativa), bem como à formação de substâncias potencialmente tóxicas. Em alguns tipos de alimentos, quantidade limitada da oxidação de lipídios é benéfica, pois leva à formação de sabor e odor desejável (queijo).

O termo oxidação de lipídios refere-se a uma série extremamente complexa de reações químicas, envolvendo ácidos graxos insaturados e oxigênio (Figura 1.1). Por conveniência, essas reações são divididas em

Lipoxigenase: esta enzima, de ocorrência em vegetal e animal, catalisa a oxigenação de alguns ácidos graxos insaturados (linoléico, linolênico e araquidônico) para seus correspondentes peróxidos, durante o armazenamento e processamento.

Mecanismo da auto-oxidação

Os peróxidos são os primeiros produtos formados da oxidação de óleos e gorduras insaturados (Figura 1.1). Do ponto de vista da deterioração do sabor do alimento, os peróxidos não são importantes e sim os produtos oriundos de sua decomposição: *aldeídos, cetonas, álcoois, hidrocarbonetos e ácidos*. As insaturações em todos os tipos de óleo e gordura representam o centro ativo pelo qual se inicia a reação de oxidação.

A formação inicial do peróxido passa necessariamente pela produção de um intermediário denominado *radical livre* ($R^{\bullet}$). Ambos são formados a partir do lipídio insaturado (RH), pela interação com o oxigênio na presença de catalisadores, ou seja, a reação inicial ocorre pela ação de alguma fonte externa de energia, como calor, luz, radiação, ou por meio de reações químicas envolvendo íons metálicos ou metaloproteínas, como heme.

Por definição, radicais livres são substâncias químicas que apresentam número ímpar de elétrons (p. 163), sendo, portanto, altamente energéticos e instáveis; podem ser formados pela ação direta de alguma fonte de energia externa (luz, calor e radiação). A energia externa, ao atingir o átomo, faz com que um elétron seja removido de seu orbital, conforme esquematizado na Figura 1.2.

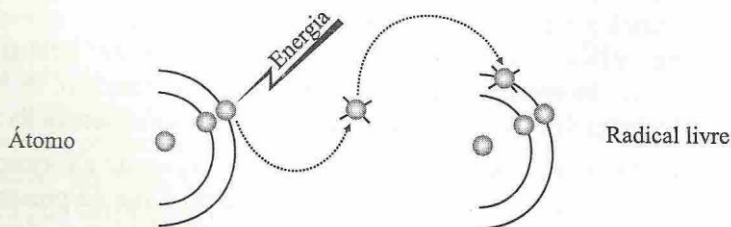


Figura 1.2 - Formação do radical livre.

Os elétrons tendem a ocorrer em pares e em rotação antiparalela, situação esta energeticamente favorável; portanto, quase todas as ligações químicas tendem a ter dois elétrons. O elétron não-pareado é aquele que se encontra solitário no orbital atômico ou molecular. A maioria das moléculas encontradas nos organismos vivos não é radical.

Toda a energia externa absorvida é transferida diretamente para o elétron, tornando-o altamente energético e instável. Em razão desta instabilidade, o elétron rapidamente procura outro átomo e transfere-lhe toda a sua energia inicial, tornando-se extremamente instável graças à energia extra acumulada. Esse novo átomo formado, contendo um elétron extra, é denominado radical livre, o qual, para se tornar estável, precisa liberar essa energia acumulada. Portanto, a transferência da energia ocorre para as substâncias localizadas na vizinhança, principalmente para os ácidos graxos insaturados, produzindo mais radicais livres, e todas estas reações realizam-se em fração de segundo.

O mecanismo de formação do primeiro radical livre ainda não está devidamente esclarecido, mas pode ser formado por irradiação, tratamento térmico e pela reação com íons metálicos. Em alimentos sempre ocorrem traços de peróxidos (formados pela ação do oxigênio singlete ou pela ação da lipoxigenase ou outras oxigenases), os quais se dissociam, com formação de radicais livres.

O oxigênio molecular ou triplete ($^3\text{O}_2$) possui dois elétrons não-pareados, sendo cada um localizado em orbitais diferentes (Figura 1.3). Esses dois elétrons possuem *spin* paralelos e, para oxidar outro átomo ou molécula aceitando o novo par de elétrons, ambos têm de estar em *spin* antiparalelo, de forma a preencher o espaço livre no orbital. Esta situação impõe restrição na oxidação, a qual tende a aceitar elétrons pelo oxigênio, um de cada vez, permitindo tempo para que ocorra a inversão do *spin* entre as colisões. Isto faz com que o oxigênio seja pouco reativo com as espécies não-radicais, tornando possível a existência de diversas substâncias orgânicas em meio aeróbico.

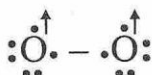


Figura 1.3 - Configuração eletrônica do oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$).

Os ácidos graxos insaturados podem ser atacados quimicamente pelo radical livre, os quais aceitam o elétron extra. Após a formação suficiente de radicais livres, a reação em cadeia é propagada pela remoção de átomos de hidrogênio localizados na posição *alfa* à dupla ligação. A adição do oxigênio ocorre, então, nessa posição, resultando um

radical peroxil ($ROO\cdot$). Este radical novamente remove o hidrogênio do carbono alfa metileno do ácido graxo insaturado, produzindo o *peróxido* ($ROOH$) e radicais livres. Em seguida, os novos radicais livres formados reagem com o oxigênio, e a reação se repete como descrito na Figura 1.1.

O triglicerídio no estado singlete não reage com o oxigênio di-radical triplete (3O_2) em razão do conflito básico existente da conservação do spin. O oxigênio do ar é um composto di-radical e, portanto, requer o triglicerídio na forma de radical para que ocorra a reação de oxidação. Portanto, para que esta reação ocorra, é necessário remoção do hidrogênio localizado no carbono do ácido graxo insaturado contendo a ligação mais fraca para se tornar então radical. O calor, luz, metais e espécies reativas oriundas do oxigênio facilitam a formação de radicais no óleo.

A energia requerida para a remoção do hidrogênio do ácido graxo é dependente da sua posição na molécula. Por exemplo, a ligação carbono-hidrogênio mais fraca presente no ácido oléico está localizada na vizinhança da insaturação (C-8 ou 11), sendo necessárias 75 Cal/mol, e, para o linoléico, está localizada no C-11 (50 Cal/mol), em razão da presença do grupo metileno ($-CH_2-$) ativado entre ligações duplas, tornando-o vulnerável à oxidação. Portanto, o hidrogênio a ser removido estará localizado neste carbono, formando o radical livre nesta posição. No caso do carbono saturado sem a presença de insaturações próxima, é de 100 Cal/mol (Figura 1.4).

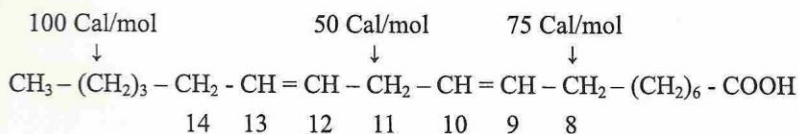


Figura 1.4 - Energia necessária para a remoção do hidrogênio durante a oxidação.

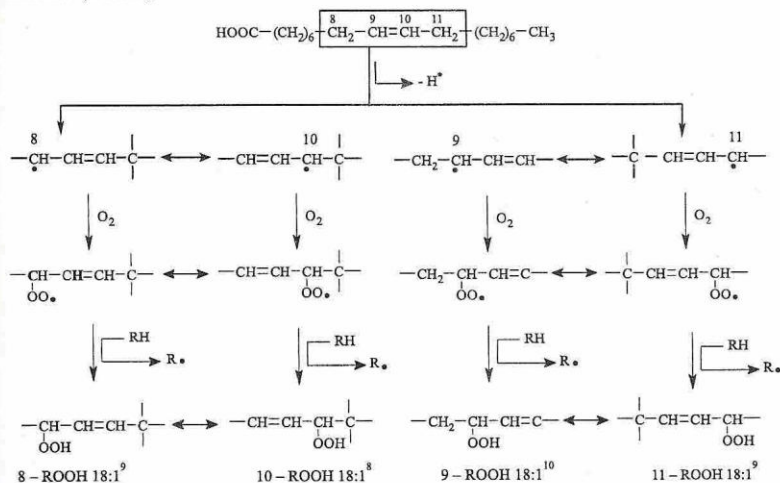
Auto-oxidação do ácido oléico

O mecanismo da auto-oxidação do ácido oléico envolve a remoção de um átomo de hidrogênio localizado no carbono 8 ou 11. A energia necessária para que isto ocorra é de 75 Cal/mol (Figura 1.4). O calor, luz, metais e espécies reativas oriundas do oxigênio facilitam a formação de radicais.

A interação entre o elétron não-pareado do carbono 8 ou carbono 11 e os elétrons (π) da ligação dupla adjacente produz dois radicais alílicos isômeros, para os quais os elétrons são deslocados, e, conseqüentemente, quatro peróxidos isômeros são possíveis de serem formados. Além da mudança de posição da insaturação, ocorre a isomerização da forma *cis-trans* e 90% do peróxido formado adquire a configuração *trans* (eq. 1.2).

eq. 1.2

Oléico (18:1⁹)



Auto-oxidação do ácido linoléico

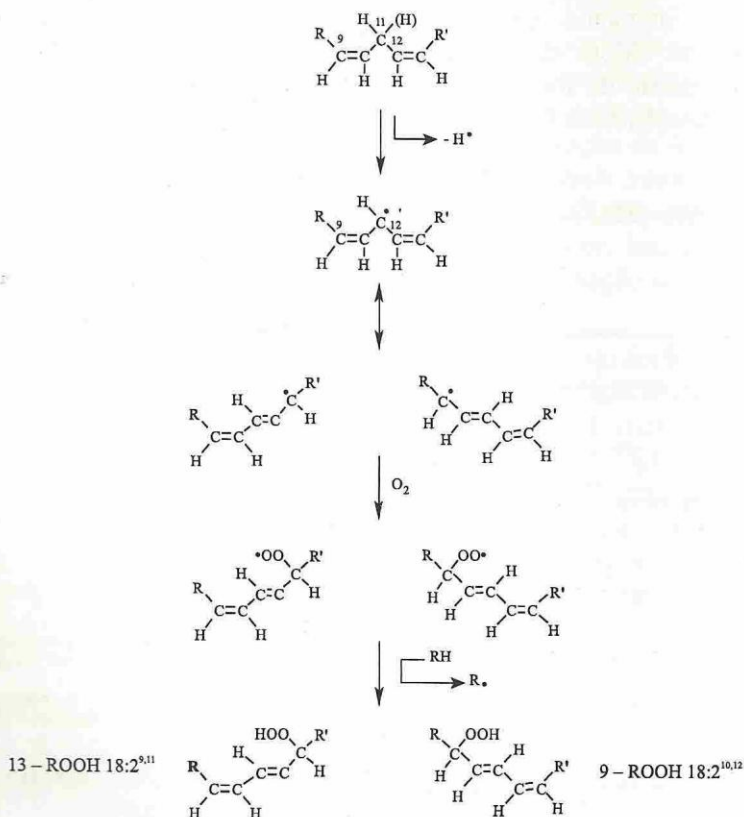
A tendência à oxidação do ácido linoléico e de outros polinsaturados é maior que a dos monoinsaturados, por causa da presença de grupos metilenos ($-\text{CH}_2-$) ativados entre ligações duplas, tornando-o bastante vulnerável à oxidação. O radical livre assim formado é, em

virtude da remoção de um átomo de hidrogênio do grupo metileno, instável; conseqüentemente, três peróxidos isômeros podem ser formados a partir do carbono 11 (eq. 1.3).

O radical localizado no carbono 11 é então rearranjado formando o conjugado pentadienil na posição 9 ou 13 contendo insaturação trans. A energia necessária para a remoção do hidrogênio localizado no C-11 do ácido linoléico é de 50 Cal/mol (Figura 1.4).

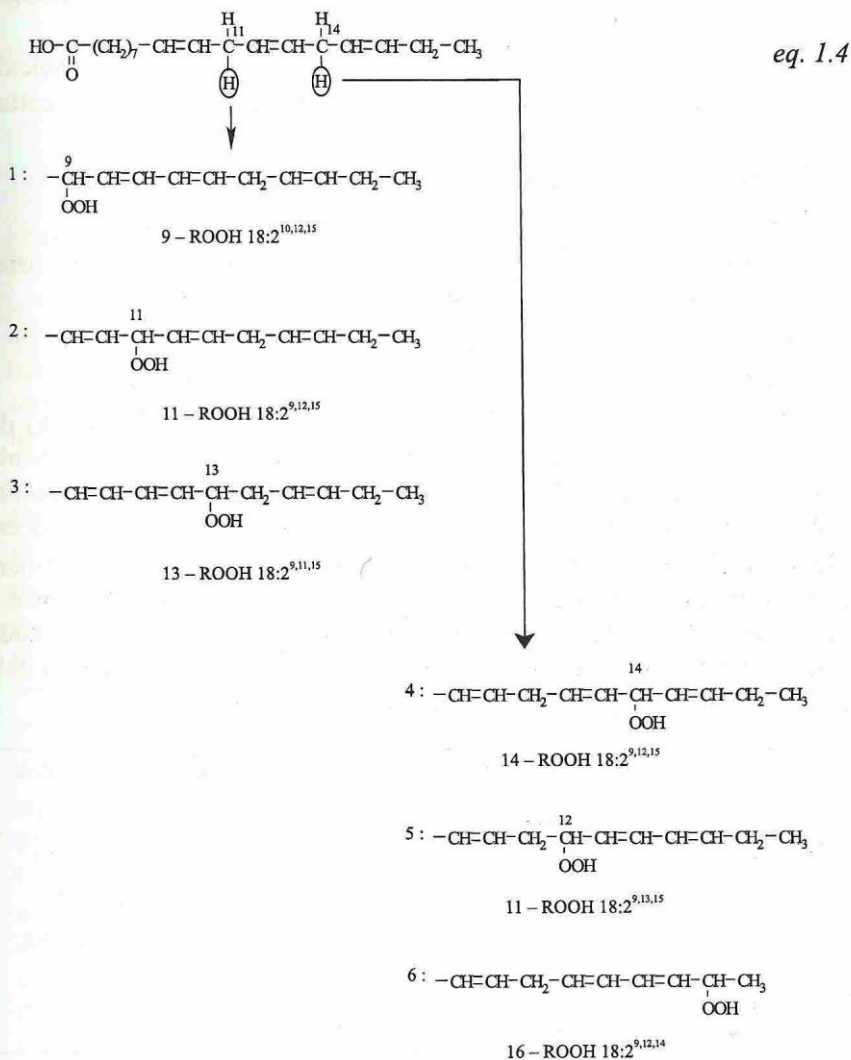
eq. 1.3

Linoléico (18:2^{9,12})



Auto-oxidação do ácido linolênico

A oxidação do ácido linolênico (eq. 1.4) inicia-se pela remoção de um átomo de hidrogênio localizado no carbono 11 ou carbono 14, com formação de três possíveis peróxidos isômeros.



Mecanismo da fotoxidação

A reação de fotoxidação é um processo oxidativo dos ácidos graxos insaturados resultante da exposição à luz, oxigênio e fotosensores. A presença destes nos tecidos animal e vegetal, como a *riboflavina*, *clorofila* e *mioglobina*, dá início ao processo de transferência de energia para a reação de formação do peróxido.

É um mecanismo alternativo independente da formação de radicais livres e dependente de sensores. A reação fotoxidativa apresenta certas características que diferem da reação de auto-oxidação, a saber:

- Não envolve a formação de radicais livres.
- É independente da pressão do oxigênio.
- É inibida pela ação de receptores de oxigênio singlete, como beta-caroteno e tocoferóis, mas não é afetada pela ação de antioxidantes.
- Não apresenta período de indução (Figura 1.6).
- Provoca mudanças na insaturação da configuração *cis* para *trans*.

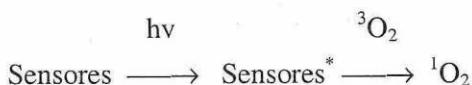
Para se entender o mecanismo da fotoxidação e diferenciá-lo do mecanismo da auto-oxidação, a configuração eletrônica do oxigênio molecular deve ser levada em consideração (Figura 1.5). O oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$) é um di-radical com dois elétrons paralelos separados em orbitais. Em razão desta peculiaridade, as moléculas de oxigênio possuem ligações interatômicas fracas. O oxigênio triplete reage com elementos e íons, formando óxidos, mas não com compostos orgânicos no estado singlete. Entretanto, reage facilmente com radicais livres produzidos pela ação de outros radicais ativos, radiação, luz UV, aquecimento etc.

Nome	Oxigênio triplete	Oxigênio singlete	Oxigênio Singlete
Símbolo	$(^3\text{O}_2)$	$(^1\text{O}_2)$	$(^1\text{O}_2)$
Energia potencial (Cal/mol)	0	24	37
Distância intramolecular (O - O)	1,2074	1,2155	1,2268
Configuração eletrônica ($:\ddot{\text{O}}\cdot - \cdot\ddot{\text{O}}:$)	$\uparrow \uparrow$ --	$\uparrow \downarrow$ --	$\uparrow \downarrow$ --

Figura 1.5 - Característica di-radical do oxigênio.

O oxigênio singlete é uma espécie altamente reativa formada pela exposição da luz sobre compostos fotossensíveis naturalmente presente nos alimentos. O sensor se torna excitado pela absorção da luz e a energia é então transferida para o oxigênio triplete formando o singlete (eq. 1.5). O oxigênio singlete atua diretamente sobre os ácidos graxos insaturados formando o peróxido.

eq. 1.5



Formação do oxigênio singlete (${}^1\text{O}_2$) em alimentos

Parece improvável que a reação direta do oxigênio com a molécula de lipídio leve à formação de peróxido facilmente, em razão do conflito básico existente de conservação do spin. A molécula de lipídio ocorre no estado singlete e o oxigênio, no estado triplete; portanto, é altamente improvável a ocorrência da reação inicial da autooxidação.

A reação direta entre o ácido graxo insaturado e o oxigênio, em sua forma mais estável, denominada *triplete* (${}^3\text{O}_2$), é altamente endotérmica (64 Cal/mole) e improvável. Portanto, alguma forma de ativação do oxigênio é necessária para facilitar a reação e a conseqüente formação do primeiro peróxido. Além da participação de pigmentos e da luz ultravioleta na reação, a molécula de oxigênio tem de estar ativada para uma configuração eletrônica apropriada, denominada oxigênio *singlete* (${}^1\text{O}_2$).

Este oxigênio não é um radical livre, mas uma espécie altamente eletrofílica, o qual reage prontamente com as substâncias de alta densidade de elétrons, como as insaturações presentes nos ácidos graxos. O oxigênio singlete pode ser produzido na atmosfera ou diretamente no alimento. É importante lembrar que a ocupação máxima de um orbital é de dois elétrons pareados e em rotação oposta. Os elétrons são partículas carregadas e, portanto, podem-se comportar como magnetos. Se o átomo de oxigênio possui dois elétrons não-pareados em seu orbital externo (Figura 1.5), estes podem-se alinhar de forma paralela ou antiparalela, sendo denominados triplete e singlete, respectivamente.

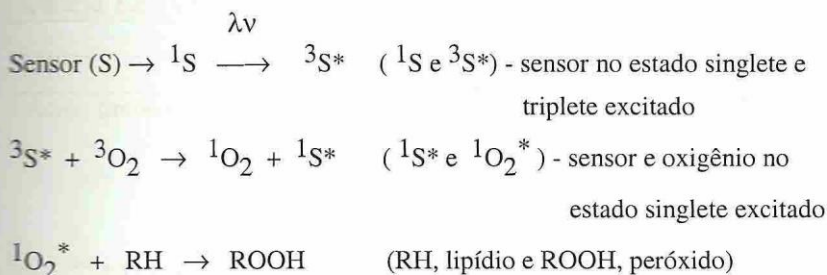
A rotação do elétron produz um campo magnético, e o oxigênio com dois elétrons não-pareados apresenta momento magnético em três estados de energia, se colocado em campo magnético. Em tal situação é denominado oxigênio triplete, que é a forma presente na natureza. Nesse estado, os dois elétrons possuem rotação paralela em orbitais diferentes, apresentando pequena energia de repulsão eletrostática.

No estado singlete, os dois elétrons possuem rotação oposta (Figura 1.5), portanto com grande força de repulsão eletrostática, resultando em um estado de excitação eletrônica. Como as ligações são formadas somente entre os elétrons que estão pareados e em rotação antiparalela, obviamente a grande maioria das moléculas é singlete. No estado triplete, o oxigênio reage preferencialmente com os radicais, i.e., moléculas que apresentam elétrons não-pareados (Figura 1.1).

A energia de ativação desta reação é muito alta; assim, a participação de iniciadores (metais, fotossensores etc.) é fundamental na formação do primeiro peróxido. Os fotossensores conhecidos, como a clorofila e a riboflavina, são capazes de converter o oxigênio triplete em singlete. O mecanismo desta conversão é iniciado pela transferência do fotossensor para o estado excitado, devido à absorção da luz na região do visível ou próximo do UV. Subseqüentemente, o fotossensor é capaz de transferir o excesso de energia para a molécula do oxigênio, passando este para o estado singlete; desta forma, ele pode reagir com a molécula de lipídio, formando o peróxido, conforme a sequência de eventos a seguir (eq. 1.6).

Estes pigmentos absorvem luz na região do visível e, ou, perto do ultravioleta (UV), tornando-se eletronicamente excitados, ou seja, os sensores passam do estado singlete para o triplete, excitados pela absorção da energia do fóton. Nesta situação, transferem a energia para o oxigênio triplete (3O_2), o que resulta na excitação da molécula do oxigênio para o estado singlete (1O_2), não sendo, portanto, consumidos e sim convertidos para um estado excitado (SENSOR*).

eq. 1.6

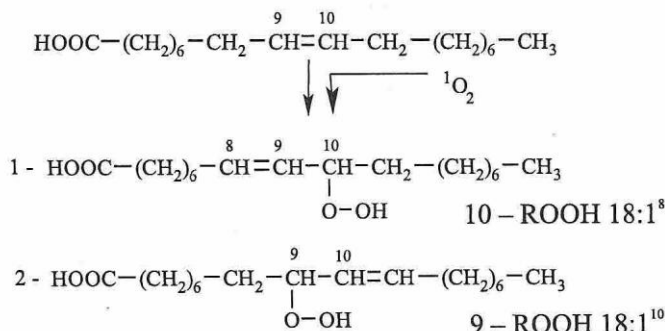


Molécula de oxigênio altamente reativa e oxigênios radicais podem ser formados a partir do oxigênio no estado tripleto, por excitação ou redução. O oxigênio assim ativado é denominado oxigênio ativo, sendo importante na degradação de alimentos, bem como de outros sistemas biológicos. O oxigênio singleto é produzido principalmente pela fotoxidação na presença de iniciadores (pigmentos) e não é capaz de promover a desidrogenação de compostos orgânicos, mas reage diretamente com as ligações insaturadas, como, por exemplo, os ácidos graxos insaturados com a formação de peróxidos.

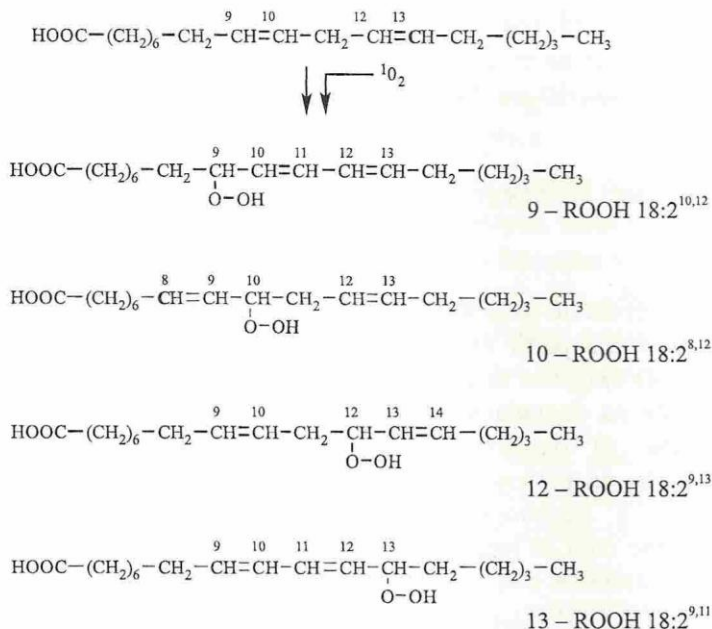
O oxigênio singleto reage diretamente com as ligações duplas por adição, formando o peróxido, no qual a posição da ligação dupla é alterada (eqs. 1.7 e 1.8). Na presença da luz e de certos fotossensores (riboflavina, mioglobina e clorofila), diferentes peróxidos são formados (Tabela 1.3).

eq. 1.7

Fotoxidação do ácido oléico (18:1⁹)



eq. 1.8

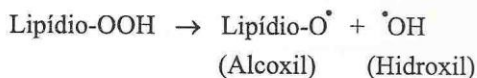
Fotoxidação do ácido linoléico (18:2^{9,12})Tabela 1.3 - Hidroperóxido formado pela auto-oxidação (³O₂) e fotoxidação (¹O₂) de ácidos graxos insaturados

Ácido graxo	Hidroperóxido		Proporção (%)	
	Posição			
	HOO-grupo	Insat.	³ O ₂	¹ O ₂
Ácido oléico	8	9	27	-
	9	10	23	48
	10	8	23	52
Ácido linoléico	8	9,12	1,5	-
	9	10,12	46,5	32
	10	8,12	0,5	17
	12	9,13	0,5	17
	13	9,11	49,5	34
	14	9,12	1,5	-

Continua...

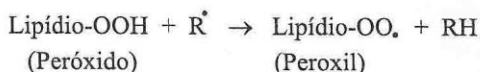
A ligação *oxigênio-oxigênio* do peróxido é relativamente fraca (46 Cal/mol), decompondo-se, mesmo à temperatura ambiente, em diversos produtos intermediários e específicos para cada tipo de ácido graxo envolvido na oxidação. São inicialmente decompostos para radical hidroxil e alcoxil (eq. 1.9), o qual, posteriormente, forma *aldeídos, cetonas, ácidos, ésteres, álcoois e hidrocarbonetos*.

eq. 1.9



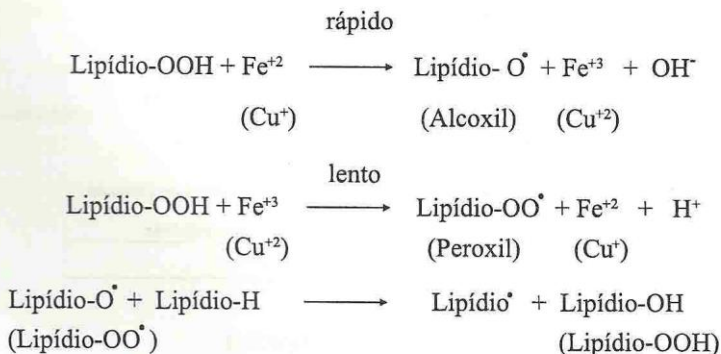
Em sistema biológico, a decomposição é geralmente induzida por outros radicais presentes no alimento. Tais intermediários podem ainda sofrer oxidação adicional e decomposição, contribuindo para a formação de novos radicais livres. Assim, o peróxido pode interagir com um radical livre oriundo de alguma fonte, formando o radical peroxil, que participa diretamente na reação de auto-oxidação (eq. 1.10).

eq. 1.10



O peróxido pode ser reduzido pelo metal, ou por outro redutor, em radicais alcoxil e peroxil, acelerando, portanto, a reação de oxidação pela decomposição do peróxido. Essa atuação dos metais é importante no progresso da auto-oxidação (eq. 1.11).

eq. 1.11



Íons metálicos não ocorrem na forma livre *in vivo*, mas ligados a proteínas, DNA e ATP. Compostos heme (Fe^{2+}) e hemina (Fe^{3+}) são largamente encontrados em alimentos. A oxidação de lipídios no tecido animal é acelerada pela hemoglobina, mioglobina e pelo citocromo C. Reações dessa natureza são freqüentemente responsáveis pela rancidez em aves e peixes durante o armazenamento e em carne cozida. O aquecimento da carne destrói a estrutura heme, provocando rápido desenvolvimento da rancidez, e o aquecimento de óleos vegetais libera metais ativos a partir de complexos inativos. A atividade catalítica de compostos heme está relacionada com a valência do ferro nos seguintes complexos:

Fe^{2+} (Diamagnético) oxi-hemoglobina: é inativo na ausência de peróxido, pois todos os seus orbitais estão completos, por isso não é esperado que inicie a formação de radicais livres e a conseqüente oxidação:

					Orbital final					
3d					4s	4p			4d	
..	..	..	..	..	..	..	..	..		
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

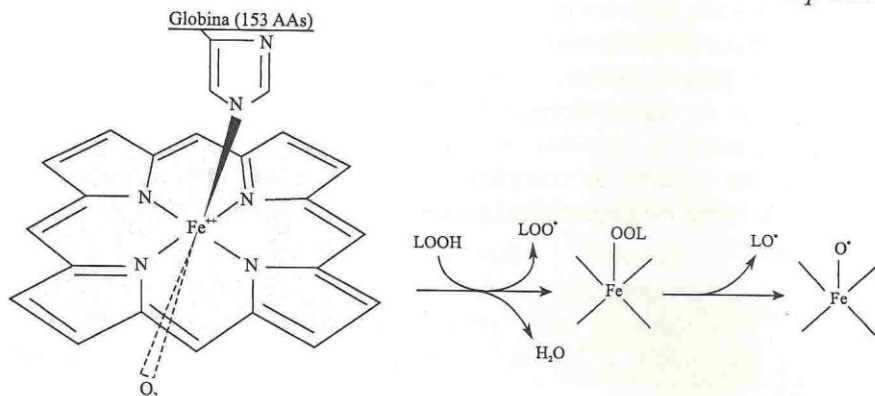
Fe^{3+} (Paramagnético) meta-hemoglobina: é deficiente de elétrons, mas possui cinco deles não-pareados, portanto apresenta forte campo magnético graças à rotação de seus elétrons. Nesta situação, espera-se iniciar a oxidação.

					Orbital final					
3d					4s	4p			4d	
.	.	.	.	.	..	..	..	..		
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

No tecido muscular, o grupo *heme* (eq. 1.12) participa como oxidante, promovendo a decomposição do complexo *heme-peróxido* em *radical peroxil* e *radical oxi-heme*. Este último abstrai um radical (H.) de outra molécula do ácido graxo insaturado e inicia um novo ciclo. A oxidação catalisada pelo grupo heme é responsável pela reação de

deterioração em carnes e peixes, limitando a vida útil destes produtos mesmo sob congelamento.

eq. 1.12



A principal proteína responsável pela cor em carnes é a mioglobina, visto que outras proteínas pigmentadas, como a hemoglobina e os Citocromos, estão presentes em quantidades relativamente pequenas. O pigmento de mioglobina possui um grupo prostético (heme) e uma porção protéica, a globina (eq. 1.12). O grupo prostético heme é formado por um anel de porfirina, que possui um átomo de ferro na posição central. Este átomo apresenta seis ligações coordenadas, capazes de aceitar seis pares de elétrons, dos quais quatro vêm de átomos de nitrogênio do anel porfirínico. O quinto par de elétrons provém do nitrogênio de um resíduo de histidina da globina. A sexta ligação coordenada do ferro está disponível para complexar com um hidrante e receber um par de elétrons.

Em carnes não-processadas, são três as principais formas químicas da mioglobina: mioglobina reduzida ou deoximioglobina (Fe^{++}) de coloração vermelho-púrpura, mioglobina oxigenada ou oximioglobina ($\text{Fe}^{++} - \text{O}_2$), de coloração vermelho-brilhante, e mioglobina oxidada ou metamioglobina (Fe^{+++}), de coloração marrom.

Durante o processamento de carne, a preocupação principal é evitar a oxidação da mioglobina, pois esta resulta na alteração inaceitável da coloração. A alta afinidade da mioglobina pelo monóxido de nitrogênio é frequentemente utilizada na prevenção da oxidação e na estabilização da cor. O mecanismo da oxidação catalisada por grupos heme é similar às reações de autooxidação e lipoxigenase.

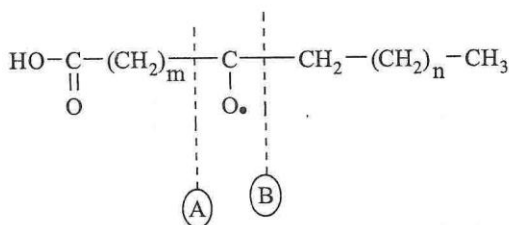
Formação de aldeídos

O mecanismo de formação do aldeído é atribuído ao *radical alcóxil* e depende da posição da ruptura da ligação carbono-carbono (eq. 1.13) adjacente ao átomo de carbono que contém o oxigênio. Os dois elétrons resultantes podem, então, formar a ligação carbonílica.

Posição B: resulta na formação do aldeído-glicerídeo não-volátil. Este fragmento contém a carboxila esterificada ao glicerol e predomina a temperatura elevada.

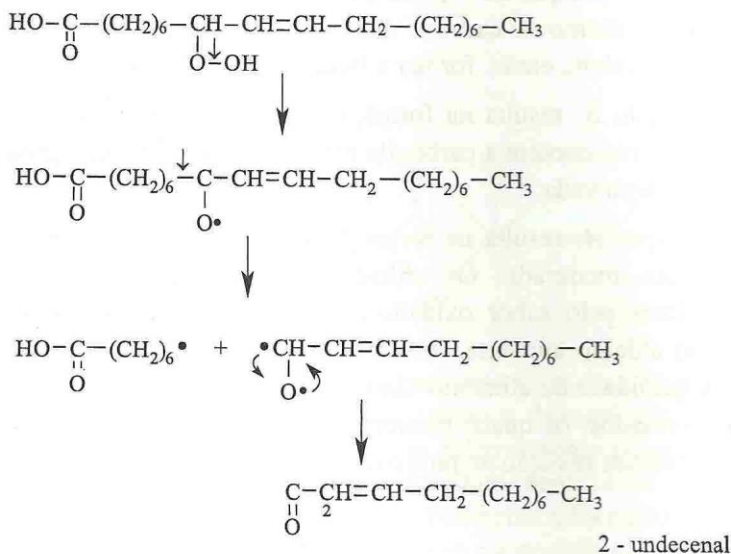
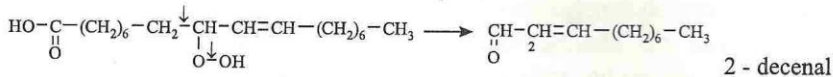
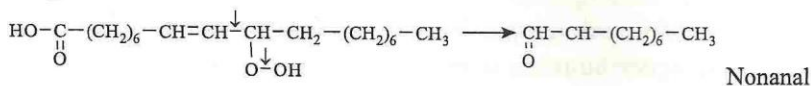
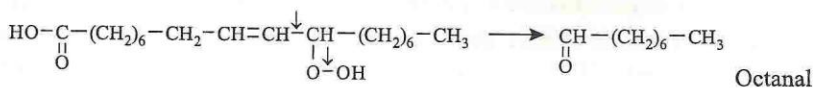
Posição A: resulta na formação de aldeído volátil e predomina a temperatura moderada. Os aldeídos voláteis são, em grande parte, responsáveis pelo sabor oxidado do produto, e a presença de ligação dupla no aldeído aumenta sensivelmente o limiar de percepção (Tabela 1.4). A qualidade do alimento não é afetada até que os compostos voláteis sejam formados, os quais, mesmo em concentração igual a 1,0 ppm ou menor, causam rejeição ao produto.

eq. 1.13



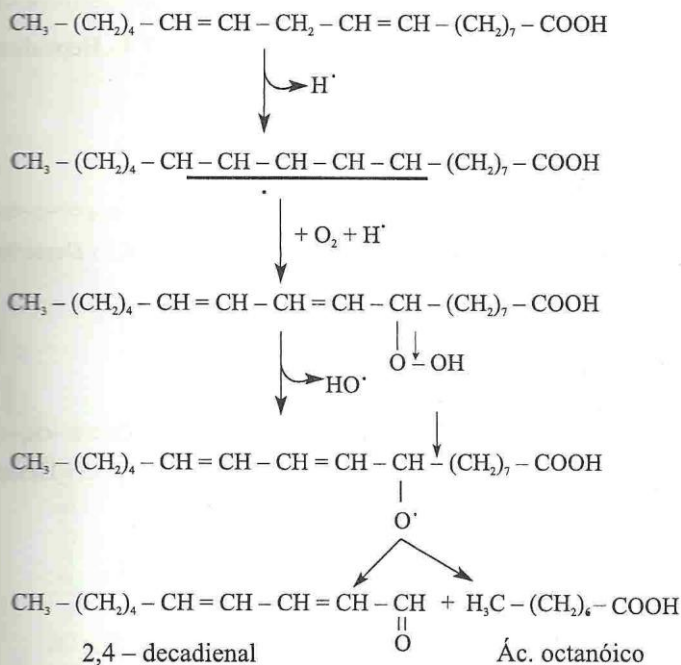
A presença de grupos metileno ($-\text{CH}_2-$) ativados pela proximidade das insaturações aumenta a velocidade de decomposição dos peróxidos. Portanto, os peróxidos oriundos do ácido linolênico decompõem-se mais facilmente que todos aqueles provenientes do oléico e do linoléico. Os exemplos a seguir ilustram a formação de aldeídos a partir do peróxido oriundo dos ácidos oléico, linoléico e linolênico:

1) Aldeídos derivados do ácido oléico

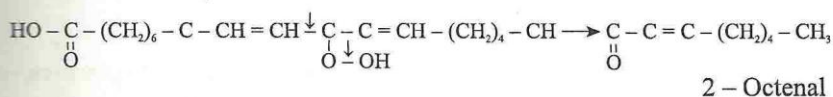
8-hidroperóxido 18:1⁹9-hidroperóxido 18:1¹⁰10-hidroperóxido 18:1⁸11-hidroperóxido 18:1⁹

2) Aldeídos derivados do ácido linolêico

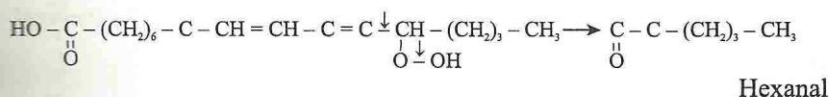
9-hidroperóxido 18:2^{10,12}



11-hidropróxido 18:2^{9,12}



13-hidropróxido 18:2^{9,11}



3) Aldeídos derivados do ácido linolênico

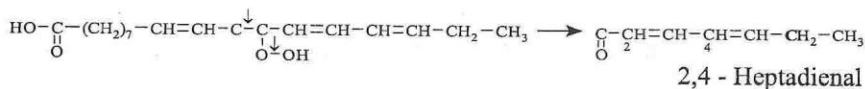
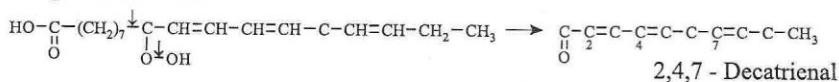
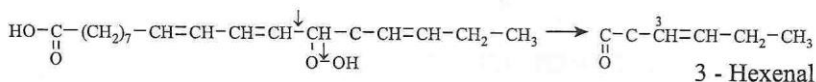
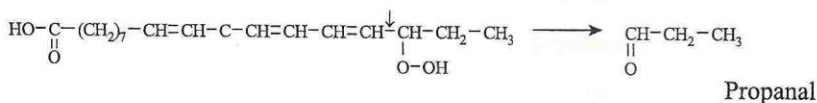
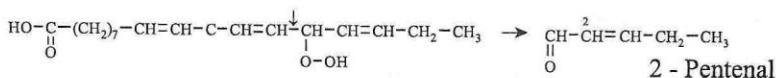
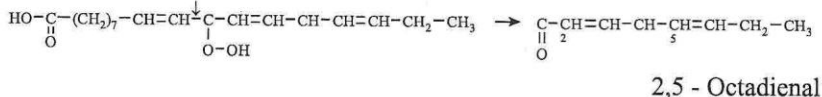
12-hidroperóxido 18:3^{9,13,15}9-hidroperóxido 18:3^{10,12,15}13-hidroperóxido 18:3^{9,11,15}16-hidroperóxido 18:3^{9,12,14}11-hidroperóxido 18:3^{9,12,15}

Tabela 1.4 - Aldeídos produzidos de ácidos graxos insaturados

Ácido graxo	Grupo metileno	Hidroperóxido formado	Aldeído formado	Limiar de percepção
OLÉICO	(11)	11-ROOH-9-ENE	Octanal	70 ppb (leite) 46 ppb (óleo)
		9-ROOH-10-ENE	2-Decenal	92 ppb (leite)
LINOLÉICO	(8)	8-ROOH-9-ENE	2-Undecenal	100 ppb (óleo) 24 ppb (leite)
		10-ROOH-8-ENE	Nonanal	22 ppb (leite) 32 ppb (óleo)
	(11)	13-ROOH-9,11-DIENE	Hexanal	50 ppb (leite) 150ppb (óleo)
		11-ROOH-9,12-DIENE	2-Octenal	70 ppb (leite) 46 ppb (óleo)
		9-ROOH-10,12-DIENE	2,4-Decadienal	28 ppb (óleo)
LINOLÊNICO	(14)	16-ROOH-9,12,14-TRIENE	Propanal	43 ppb (leite) 160 ppb (óleo)
		14-ROOH-9,12,15-TRIENE	2-pentenal	130 ppb (leite) 150 ppb (óleo)
		12-ROOH-9,13,15-TRIENE	2,4-heptadienal	50 ppb (leite)
		(11)	3-Hexenal	
			2,5-Octadienal	
		9-ROOH-10,12,15-TRIENE	2,4,7-decatrienal	

Continua...

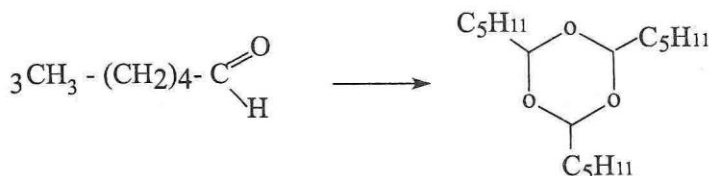
Tabela 1.4 - Cont.

Ácido graxo	Grupo metileno	Hidroperóxido formado	Aldeído formado	Limiar de percepção
ARAQUIDÔNICO	(13)	15-ROOH-5,8,11,13-TETRAENE	hexanal	
		13-ROOH-5,8,11,14-TETRAENE	2-octenal	
		11-ROOH-5,8,12,14-TETRAENE	2,4-decadienal	
	(10)	12-ROOH-5,8,10,14-TETRAENE	3-nonenal	
		10-ROOH-5,8,11,14-TETRAENE	2,5-undecadienal	
		8-ROOH-5,9,11,14-TETRAENE	2,4,7-tridecatrienal	
	(7)	9-ROOH-5,7,11,14-TETRAENE	3,6-dodecadienal	
		7-ROOH-5,8,11,14-TETRAENE	2,5,8-tetradecatrienal	
		5-ROOH-6,8,11,14-TETRAENE	2,4,7,10-hexadecatetraenal	

Adicional decomposição de aldeídos

Os aldeídos são a principal classe de compostos originados da oxidação. O fato de muitos deles serem encontrados em gorduras oxidadas, entretanto, não pode ser explicado tomando-se como base a ruptura clássica dos hidroperóxidos discutidos anteriormente. Por exemplo, aldeídos saturados podem ser facilmente oxidados para ácidos correspondentes, como também participar das reações de dimerização e de condensação. Três moléculas de hexanal, por exemplo, podem combinar-se, formando o *tripentiltroxano* (eq. 1.14), que possui odor muito forte e tem sido detectado como produto da oxidação secundária do linoléico. A oxidação de aldeídos insaturados ocorre de forma semelhante à dos ácidos graxos, i. e., remoção do hidrogênio da posição α -metileno, dando origem a hidrocarbonetos, aldeídos e dialdeídos de cadeia curta.

eq. 1.14



Formação de álcool e hidrocarboneto

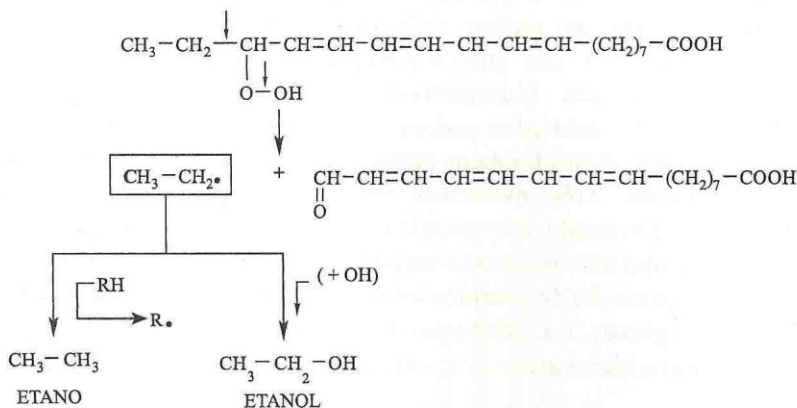
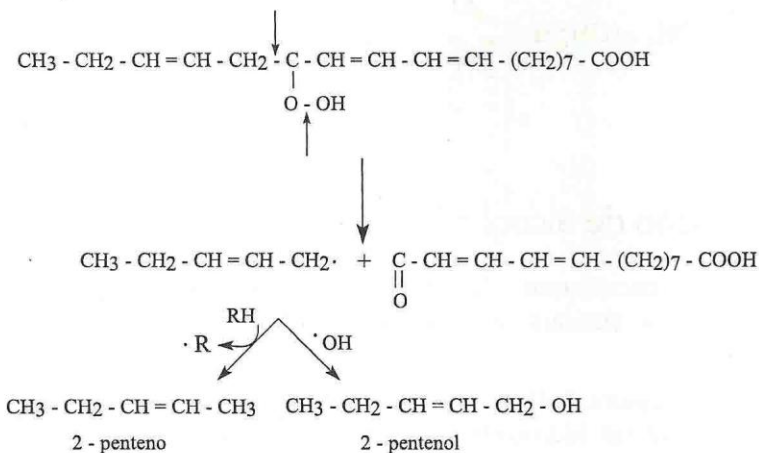
Os mecanismos de formação de álcoois e hidrocarbonetos (eq. 1.15) são similares e formados a partir da ruptura do radical alcóxil, ou seja:

- A ruptura da ligação C-C do radical alcóxil, *Posição B* (eq. 1.13), libera o radical hidrocarboneto (alquil), o qual pode interagir com o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), formando *álcool*.

- O radical alquil proveniente da ruptura da ligação C-C do radical alcóxil pode remover o hidrogênio do triglicerídio insaturado, formando *hidrocarboneto*.

16-hidroperóxido 18:3^{9,12,14}

eq. 1.15

13-Hidroperóxido 18:3^{9,11,15}

Mecanismo Enzimático: Lipoxigenase

A enzima lipoxigenase é uma dioxigenase de ocorrência em vegetal (legumes, cereais, frutas) e animal (eritrócito e leucócito) que catalisa a oxigenação de alguns ácidos graxos insaturados para seus correspondentes peróxidos, que possuem a mesma estrutura daqueles obtidos pela auto-oxidação. Concentrações elevadas de lipoxigenase são encontradas em soja e

ervilha e alguns tipos de feijão, enquanto amendoim e trigo possuem de 1 a 2% da quantidade encontrada na soja.

A ação da enzima lipoxigenase no alimento apresenta efeitos desejáveis importantes e outros indesejáveis, resultantes da ação direta da enzima na oxidação de ácidos graxos polinsaturados (livre ou ligado), formando radicais livres. Funções desejáveis, como o branqueamento da farinha de trigo e a formação de pontes de enxofre no glúten durante a formação da massa, eliminam a necessidade de adição de oxidantes químicos, como bromato de potássio. Ações indesejáveis no alimento é a destruição de clorofila e carotenos, o desenvolvimento de sabor e odor estranhos, a oxidação de compostos como vitaminas e proteínas e a oxidação de ácidos graxos essenciais: linoléico, linolênico e araquidônico.

As implicações da ação da lipoxigenase na cor, na textura, no *flavor* e nas propriedades nutritivas do alimento podem ser resumidas conforme mostrado no Quadro 1.1.

Quadro 1.1 - Alterações na qualidade do alimento pela ação da lipoxigenase (endógena ou exógena)

1 - Alteração na cor

- Branqueamento da farinha de trigo pela destruição do caroteno (desejável).
- Destruição da coloração verde devida à clorofila em vegetais congelados (indesejável).
- Destruição de corantes adicionados ao alimento.

2 - Alteração no *flavor*

- Produção de componentes voláteis responsáveis pelo aroma desejável em frutas e vegetais.
- Produção de *flavor* estranho em vegetais congelados e em cereais armazenados.

3 - Alteração na textura

- Efeitos favoráveis nas propriedades reológicas da farinha de trigo e eventualmente na textura de produtos à base de trigo. A oxidação do lipídio pela ação da lipoxigenase melhora as características da massa possivelmente pela formação de pontes de enxofre envolvendo a cisteína do glúten, eliminando a necessidade do uso de oxidantes químicos (bromato de potássio).
- Simultaneamente ocorre liberação do lipídio da proteína oxidada, ajudando de alguma forma a retenção do gás durante a expansão da massa.

4 - Alterações na qualidade nutritiva

- Destruição da vitamina A e pró-vitamina A.
 - Destruição de ácidos graxos polinsaturados essenciais.
 - Interação de produtos oriundos da ação enzimática com aminoácidos essenciais na proteína, diminuindo a qualidade nutricional.
-

A dioxigenase catalisa a oxidação de certos ácidos graxos poliinsaturados, produzindo hidroperóxidos conjugados insaturados. A enzima é também capaz de formar radicais livres, os quais podem atacar outros constituintes. A reação catalisada pela lipoxigenase pode ser dividida em três estádios:

- 1 – ativação da enzima nativa;
- 2 – remoção de um próton do grupo metileno ativado; e
- 3 – incorporação do oxigênio no substrato com a formação de peróxido.

Os produtos iniciais da ação da lipoxigenase não acumulam nas células, são degradados numa variedade de produtos contendo C6 e C9 através da ação das hidroperóxido liases e, ou, isomerases. Esses compostos carbonílicos voláteis são *aldeídos*, *cetonas* e *álcoois*. Vários destes possuem *flavor* e odor desagadáveis. A lipoxigenase catalisa também a co-oxidação de pigmentos, como carotenóides e clorofilas, utilizando radicais livres.

A lipoxigenase oxida somente ácidos graxos, os quais possuem o *sistema cis-cis-1,4-pentadiene*. Portanto, os substratos preferidos pela enzima de ocorrência em vegetal são os *ácidos linoléico* e *linolênico* e, pela enzima animal, o *araquidônico*; o ácido oléico não se oxida. Além da destruição destes ácidos graxos essenciais, ocorre o aparecimento de sabor e odor desagradáveis no vegetal. O radical peroxil formado durante a oxidação promove alterações de outros componentes, como caroteno, vitamina A e proteínas. Os ácidos carboxílicos e álcoois são transformados, não enzimaticamente, em ésteres de odor característico.

A enzima lipoxigenase é responsável por substancial oxidação de lipídios em alimentos, participando tanto da fase inicial como da de propagação. A formação de produtos oriundos da oxidação de lipídios, a partir do linoléico e linolênico, ocorre por meio de uma série de reações (Figura 1.7).

- Os lipídios, fosfolipídios e glicolipídios são hidrolisados pela ação de lipases, liberando ácidos graxos livres, entre eles o linoléico e linolênico.

- Esses dois ácidos graxos insaturados são oxidados pela lipoxigenase ou por íons metálicos, entre eles compostos heme na presença do oxigênio formando hidroperóxidos.

Mecanismo de ação enzimática

A região do ácido graxo específico da reação, isto é, a preferência por certas posições da cadeia de carbono, e a estereoespecificidade, ou seja, a preferência por um dos dois possíveis hidrogênios do átomo de carbono, pode ocorrer tanto na posição superior como na inferior (L ou D).

No caso do ácido linoléico (Figura 1.8), a enzima remove um átomo de hidrogênio da posição 11 e adiciona oxigênio no lado oposto ao hidrogênio removido, ou seja, na posição 9 ou 13 do radical livre ressonante, formando o peróxido.

A variação na relação de isômeros formados (9-ROOH e 13-ROOH) depende da isoenzima envolvida. Portanto, a lipoxigenase de diferentes fontes difere, em especificidade, quanto a substrato, pH e atividade oxidativa. As mais importantes e conhecidas são as lipoxigenases L_1 e L_2 , cujos pH ótimos são 9,5 e 6,0, respectivamente.

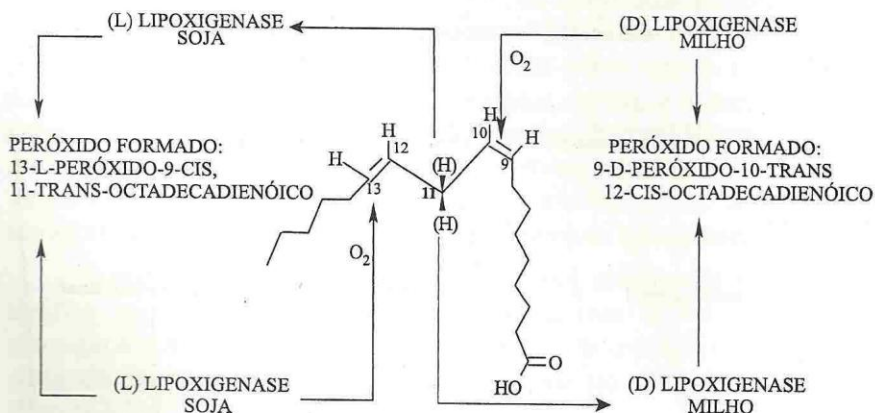
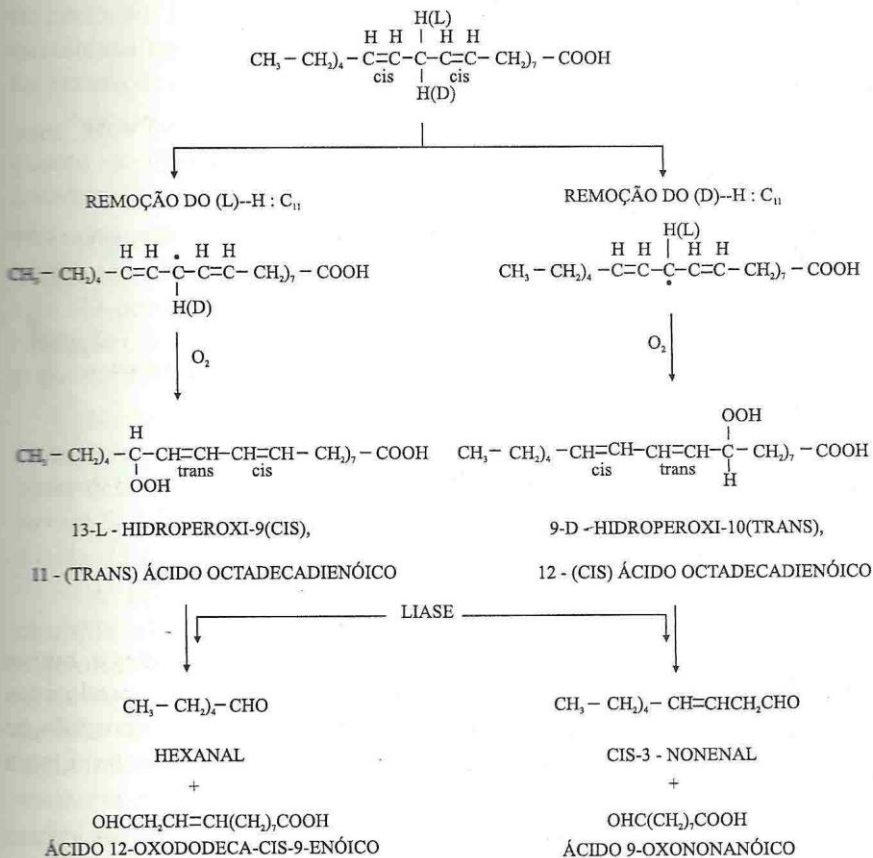


Figura 1.8 - Oxigenação estereoespecífica do ácido linoléico pela lipoxigenase.

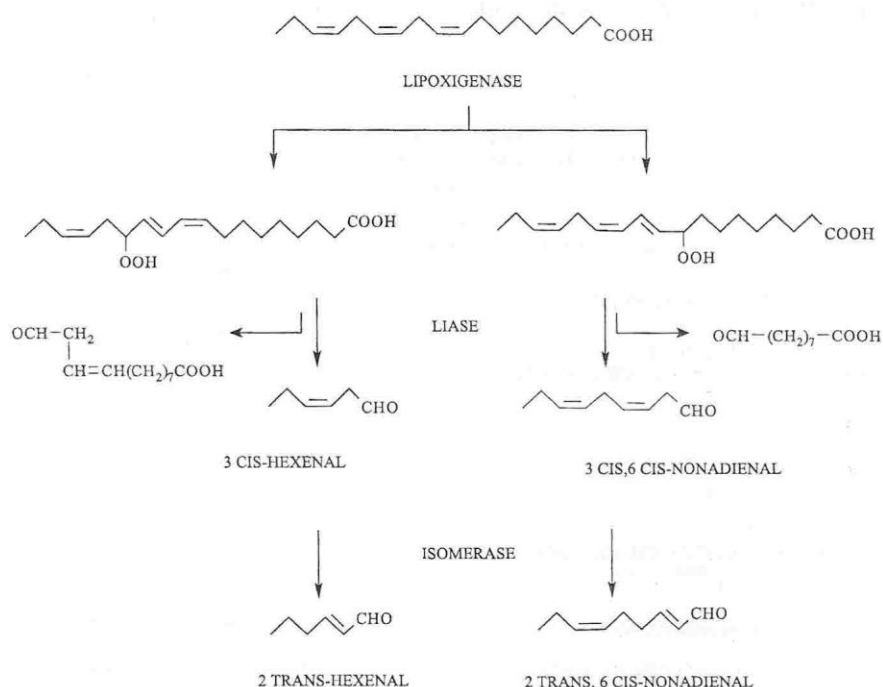
O peróxido é o produto imediato da ação da enzima lipoxigenase. Em vegetais, a ação de outra enzima, a *peróxido liase*, evita o acúmulo de

peróxido na célula, catalisando a reação de degradação com formação de aldeídos responsáveis pela deterioração do *flavor* (eqs. 1.16 e 1.17).

eq. 1.16



eq. 1.17



Além do mais, carotenos, compostos sulfurosos e vários outros componentes sensíveis são atacados pelos radicais livres produzidos durante a reação. Portanto, material rico em lipoxigenase é submetido ao branqueamento, que consiste em um aquecimento rápido do material para inativar a enzima.

A lipoxigenase é uma proteína que contém ferro em seu centro ativo. A enzima é ativada pelo peróxido, e o Fe^{++} , durante sua ativação, é oxidado para Fe^{+++} , pela transferência de um elétron para o oxigênio. O mecanismo dessa reação apresenta os seguintes estádios (Figura 1.9):

- Remoção do átomo de hidrogênio do carbono alfa metileno do substrato 1,4-pentadieno e oxidação do átomo de hidrogênio para próton.
- O radical pentadienil ligado à enzima é então rearranjado para um conjugado diene, seguido da absorção do oxigênio.

- O radical peroxil formado é então reduzido pela enzima, e, após a interação com um próton, o peróxido é liberado.

A reação catalisada pela lipoxigenase é iniciada mesmo na ausência de peróxido. Isto significa que a enzima por si só é capaz de remover a quantidade necessária de energia para iniciar a reação. As propriedades da enzima de ocorrência em vegetais podem ser divididas em dois tipos:

Tipo I – oxida somente ácidos graxos livres, produzindo tanto o 9-quanto o 13-peróxido, em proporções diferentes, a partir do ácido linoléico (eq. 1.16).

Tipo II – atua mais como catalisador da oxidação e com muito menos especificidade para o ácido linoléico, com o qual se produzem o 9-e o 13-peróxido em quantidades iguais (como na reação de auto-oxidação). Reage também com o substrato esterificado, não requerendo, portanto, a liberação do ácido graxo pela ação de lipases.

Na oxidação do ácido araquidônico pela lipoxigenase, o produto formado da primeira oxigenação é o *15-L peróxi-5-cis, 8-cis, 11-cis, 13-trans-ácido ecosatetraenóico*, enquanto o da segunda é o *8-D, 15-L peróxi-5-cis, 9-trans, 11-cis, 13-trans e 5-D, 15-L peróxi-6-trans, 8-cis, 11-cis, 13-trans ácido eicosatetraenóico*.

A lipoxigenase tipo II atua na co-oxidação do caroteno e da clorofila (Figura 1.10), degradando estes pigmentos para produtos incolores. Esta propriedade é utilizada no branqueamento da farinha de trigo. A adição da lipoxigenase, na forma de pequenas quantidades de farinha de soja desengordurada (1,0%), à farinha de trigo, além de melhorar suas propriedades reológicas, provoca-lhe o branqueamento. A melhoria observada é atribuída à oxidação do lipídio da farinha de trigo pela lipoxigenase. O peróxido formado pela ação da enzima oxida grupos tióis do glúten com formação de ligações cruzadas, favorecendo melhor a retenção de gás (isto resultará em massa com volume maior, melhor textura e mais resistente à movimentação).

O envolvimento dessa enzima na reação de co-oxidação pode ser explicado pela possibilidade de o radical peroxil não ser totalmente convertido em peróxido, como ocorre na reação catalisada pela lipoxigenase tipo I. Assim, uma fração do radical peroxil livre é liberada pela enzima, removendo um átomo de hidrogênio, que pode ser tanto do ácido graxo insaturado quanto do pigmento.

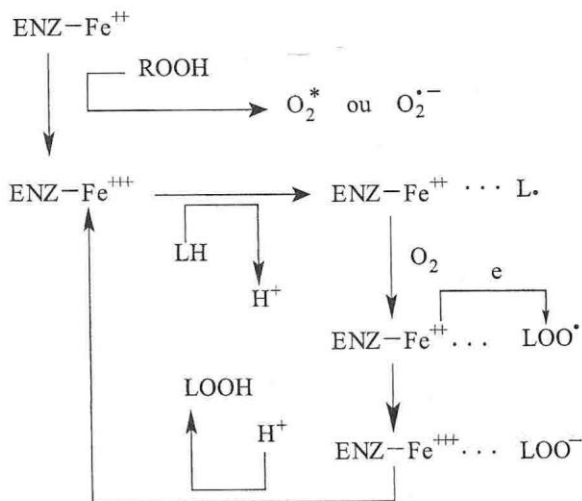
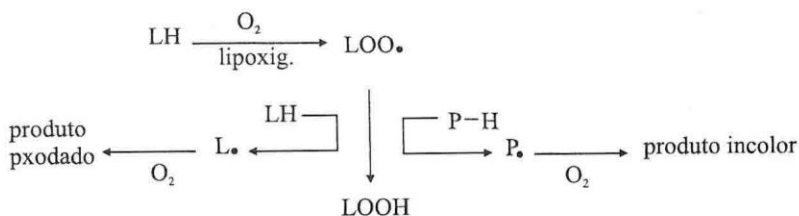


Figura 1.9 - Mecanismo da reação lipoxigenase tipo I.



LH : ácido linolêico

LOO $\cdot$: ácido linolêico

LOOH : ácido linolêico

P-H : pigmento (caroteno, clorofila)

Figura 1.10 - Reação da lipoxigenase tipo II.

A lipoxigenase catalisa a peroxidação de ácidos graxos polinsaturados que possuem o sistema cis, cis-1,4-pentadiene. Na semente de soja são encontradas três lipoxigenases isoenzimas, denominadas L-1, L-2 e L-3, as quais diferem na especificidade pelos substratos e no comportamento enzimático. Cada enzima, portanto, pode

estar envolvida na oxidação de substratos em diferentes modos de ação quando a soja é esmagada ou danificada. O produto da oxidação – *peróxido* – decompõe-se adicionalmente em aldeídos de comprimento de cadeia média e álcoois, que são os responsáveis pelo sabor de feijão cru, bem como em ácidos triidroxilados, que conferem sabor amargo da soja, limitando sua utilização na forma de grãos e da proteína como ingrediente em certos produtos. O peróxido formado pela ação enzimática também oxida os grupos sulfidríla dos homogenatos de proteínas, resultando na diminuição da habilidade de formação de gel.

O aquecimento (branqueamento) é utilizado comercialmente para suprimir a atividade da lipoxigenase e, conseqüentemente, evitar a formação do *flavor* desagradável em produtos derivados da soja. Entretanto, a quantidade de calor necessária para inativar a lipoxigenase freqüentemente resulta em alguma insolubilização nas proteínas da soja, além do odor cozido desagradável. Portanto, o problema lipoxigenase não está inteiramente resolvido, sendo o principal fator que limita a utilização de produtos derivados da soja.

Soja deficiente em lipoxigenase L-2 apresenta significante diminuição do aldeído hexanal, que é o principal constituinte responsável pelo sabor de feijão cru; portanto, o desenvolvimento de variedades de soja deficientes em lipoxigenase L-1, L-2 e L-3 seria de grande interesse para a indústria de alimentos.

Rancidez Hidrolítica

Durante o armazenamento de alimentos, a fração lipídica presente é lentamente hidrolisada pela água à temperatura elevada (processo físico), ou por enzimas lipolíticas naturais ou produzidas por bactérias e fungos contaminantes, contribuindo para a rancificação hidrolítica do alimento.

Os ácidos graxos de 14-22 carbonos liberados são sensorialmente inativos, mas ácidos graxos contendo 4-10 átomos de carbono conferem típico *off-flavor* em alimentos ou atuam como precursores de outras substâncias de *flavor* ativo. Por exemplo, os ácidos octanóico, decanóico e dodecanóico produzidos pela hidrólise das gorduras de coco e dendê conferem sabor de sabão a produtos de confeitaria. O limiar de percepção em água dos ácidos *butírico* (C_4), *capróico* (C_6), *caprílico* (C_8), *cáprico* (C_{10}) e *láurico* (C_{12}) é de 0,5 a 10,0 ppm.

As enzimas lipolíticas consistem de dois grupos principais: *lipases* e *fosfolipases* A_1 e A_2 . As lipases, ao contrário das reações enzimáticas convencionais que ocorrem em solução aquosa, são ativas na interface da emulsão lipídio-água; portanto, a homogenização e emulsificação estimulam a atividade enzimática (Figura 1.11).

As lipases estão frequentemente presentes em múltiplas formas e diferem em especificidade de acordo com sua origem. Por exemplo, a lipase do leite hidrolisa o ácido graxo localizado no carbono-1, enquanto a lipase do *Staphylococcus aureus* tem preferência pelo ácido graxo localizado no carbono-2 do glicerol.

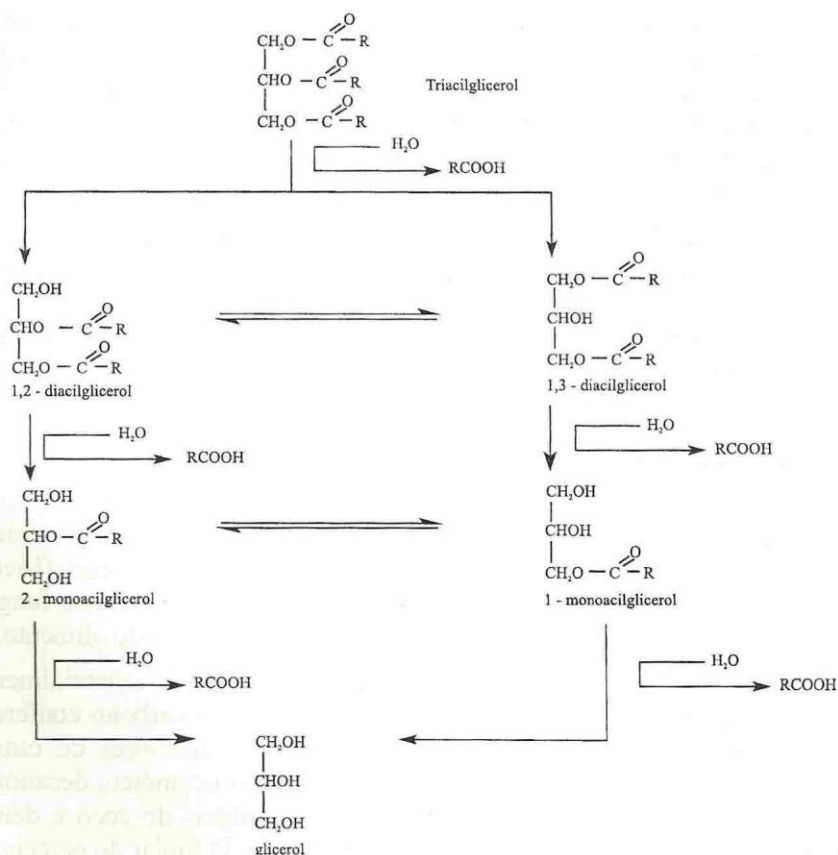


Figura 1.11 - Hidrólise do triacilglicerol.

A hidrólise não-enzimática de lipídios é muito lenta, exceto quando estes são aquecidos na presença de água à temperatura elevada (sob pressão ou durante tempo de aquecimento prolongado). Os ácidos graxos livres são virtualmente inexistentes no tecido vivo, entretanto podem ser liberados pela ação enzimática (lipase) após a morte do tecido ou a colheita, caso esta enzima não seja inativada. Os efeitos da reação de hidrólise podem ser minimizados pelo armazenamento a frio e, ou, pela esterilização.

Com a trituração ou maceração do tecido animal ou vegetal, a lipase é liberada e atuará no lipídio, liberando os ácidos graxos. Em cereais e derivados (milho, trigo, cevada, aveia etc.), a hidrólise pode ocorrer durante o armazenamento inadequado, nas operações de processamento e no produto final. A atividade da lipase está concentrada na camada mais externa do grão. Por exemplo, lipase em arroz promove a rancidez hidrolítica em grãos não polidos durante o armazenamento, afetando a qualidade tanto do grão quanto do óleo. O resultado da hidrólise em cereais pode ser manifestado de diversos modos:

- 1 - *Off-flavor* – por exemplo, sabor de sabão.
- 2 - Aumento da acidez e redução do pH.
- 3 - Aumento na sensibilidade dos ácidos graxos à oxidação.
- 4 - Alterações nas propriedades funcionais. Por exemplo, aumento de ácido graxo livre na farinha de trigo resulta na massa com baixa capacidade de retenção de gás.

As alterações do lipídio durante o armazenamento de grãos dependem do teor de umidade. Grãos secos podem ser armazenados por vários anos em temperaturas baixas, mas, se o teor de água excede a 14,0%, rápida hidrólise é iniciada (Tabela 1.5).

Tabela 1.5 - Efeito do teor de umidade sobre o índice de acidez em grãos de soja armazenados a 37 °C

% Umidade	I.A.
12	1,0
13	1,1
15	1,5
16	1,8
18	7,0

Em *leite e derivados*, como em outras emulsões do tipo água/óleo, pode ocorrer a rancificação, caso não sejam tratados termicamente de forma adequada. Lipases extracelulares produzidas por alguns tipos de microrganismos provocam a rancificação em manteiga, liberando preferencialmente ácidos graxos de cadeia curta, em razão da sua polaridade elevada. A lipólise é indesejável para alguns produtos devido à formação de *flavor* e odor estranho (rancidez hidrolítica). No entanto, quantidade limitada de lipólise é benéfica à qualidade de alguns produtos (queijo, iogurte) pela formação de sabor e odor desejável.

Espécies Reativas Oriundas do Oxigênio (ErO_2)

As espécies reativas oriundas do oxigênio (ERO_2) é um termo coletivo que incluem radicais e não-radicais derivados do oxigênio. São formadas por mecanismos *enzimáticos*, *químico*, *fotoquímico* e *por irradiação* do alimento. Os radicais oriundos do oxigênio são: *ânion superóxido* (O_2^-), *hidroxil* ($\text{HO}^\cdot$), *peroxil* ($\text{ROO}^\cdot$), *alcoxil* ($\text{RO}^\cdot$) e *hidroperoxil* ($\text{HOO}^\cdot$). Os não-radicais são os *peróxidos de hidrogênio* (H_2O_2), *ozônio* (O_3) e *oxigênio singlete* ($^1\text{O}_2$).

Esses radicais são os principais responsáveis pela iniciação das reações de oxidação de lipídios, proteínas, carboidratos e vitaminas em alimentos (Figura 1.12). A oxidação de lipídios produz compostos voláteis indesejáveis (aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos); em proteínas promovem a formação de ligações cruzadas ou sua ruptura; em açúcares produzem a formação de compostos carbonílicos de baixo peso molecular; e as vitaminas, bem como os aminoácidos, são mais facilmente oxidadas pelo oxigênio singlete que os lipídios e açúcares.

O radical hidroxil ($\text{HO}^\cdot$) é o mais reativo seguido do oxigênio singlete. O peróxido de hidrogênio e o ânion superóxido são importantes precursores para a formação do oxigênio singlete e do radical hidroxil. O oxigênio singlete é um composto eletrofilico contendo elevado teor de energia. Reagem facilmente com ácidos graxos polinsaturados e aminoácidos aromáticos, os quais são moléculas ricas em elétrons (insaturações).

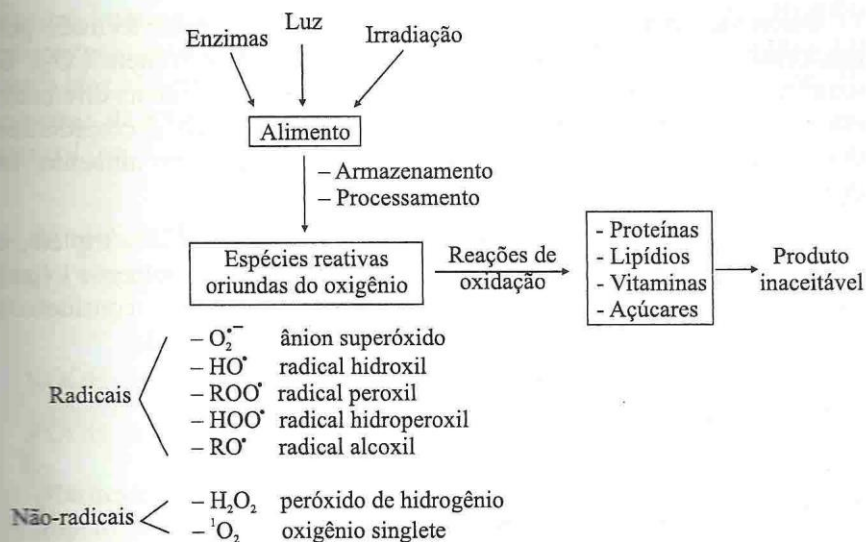


Figura 1.12 - Alterações químicas do alimento durante o processamento e armazenamento.

O potencial de redução das espécies reativas é mostrado na Tabela 1.6. O radical hidroxil possui o mais elevado potencial de redução (2.310 mV) dentre as espécies reativas conhecidas. É um forte agente oxidante e extremamente eletrofílico, reage com compostos aromáticos e ligações duplas por adição. Quanto mais elevado o potencial de redução, maior é a capacidade oxidante do composto. O radical hidroxil, além de extremamente eletrofílico, possui elevado potencial de redução podendo reagir com qualquer componente do alimento.

Tabela 1.6 - Potencial de redução das espécies reativas oriundas do oxigênio

Espécie	Potencial de redução (mV)
$HOO^{\bullet}$	1.060-1.500
$O_2^{\bullet -}$	940
H_2O_2	320
$ROO^{\bullet}$	1.000
$RO^{\bullet}$	1.600
$HO^{\bullet}$	2.310

1 - **Ânion superóxido** (O_2^-) – O ânion superóxido pode ser formado por mecanismo enzimático e químico a partir do oxigênio triplete (3O_2). O oxigênio triplete possui dois elétrons não-pareados em orbitais diferentes em rotação paralela (Figura 1.5). Havendo configuração, é considerado di-radical e, portanto, não reage com os componentes do alimento, os quais não são compostos radicais, a menos que se tornem.

Quando o elétron é adicionado ao orbital do oxigênio triplete, o ânion superóxido é então formado. Nesta situação, possui somente 1 (um) elétron não-pareado em seu orbital, sendo, portanto, considerado composto radical (Figura 1.13).

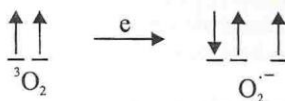
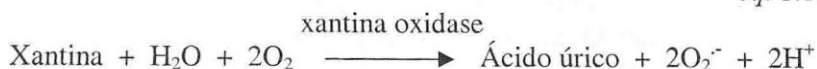


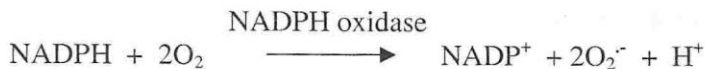
Figura 1.13 - Configuração eletrônica do ânion superóxido.

Os mecanismos enzimáticos de formação do ânion superóxido em alimentos ocorrem pela ação da enzima xantina oxidase, a qual atua sobre a xantina ou hipoxantina na presença do oxigênio triplete (eq. 1.18), ou pela ação semelhante da enzima NADPH oxidase presente no alimento (eq. 1.19).

eq. 1.18



eq. 1.19



2 - **Radicais hidroperoxil e peroxil** ($HOO\cdot$ e $ROOH$) – O radical hidroperoxil é a forma protonada do ânion superóxido, formado pela reação entre o peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil ($HO\cdot$). eq. 1.20

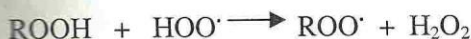
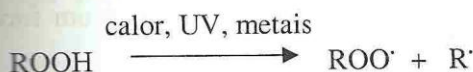
eq. 1.20



Os radicais peroxil ($ROO\cdot$) são formados pela reação direta do oxigênio triplete com os radicais alquil ($R\cdot$) durante a oxidação de ácidos

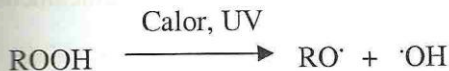
graxos insaturados, e a formação subsequente do peróxido (ROOH) ocorre pela remoção do hidrogênio de outras moléculas insaturadas. Os peróxidos são estáveis à temperatura ambiente; entretanto, calor, luz UV e metais de transição aceleram a sua decomposição, produzindo radicais peroxil (eq. 1.21).

eq. 1.21



3 - Radicais hidroxil e alcóxil ($HO^{\cdot}$ e $RO^{\cdot}$) – A reação de homólise do hidroperóxido é acelerada pela luz UV, calor ou metais de transição com a formação desses radicais (eq. 1.22).

eq. 1.22



4 - Água oxigenada (H_2O_2) – Pode ser formada pela reação entre o hidroperóxido e o radical peroxil (eq. 1.23).

eq. 1.23



5 - Oxigênio singlete (1O_2) – O oxigênio singlete não é um composto radical em razão de não apresentar elétrons não-pareados (Figura 1.5). A sua formação ocorre na presença do oxigênio triplete e de sensores (pigmentos, riboflavina) presentes no tecido animal e vegetal. Esses pigmentos absorvem energia da luz e transfere para o oxigênio triplete, formando o oxigênio singlete. Esta é a principal rota de formação do oxigênio singlete em alimentos.

O oxigênio singlete pode reagir diretamente com os compostos ricos em elétrons, como as moléculas insaturadas. Os tocoferóis, carotenóides, fenólicos, ascorbato e uratos possuem efeito amortecedor/receptor do oxigênio singlete.

Reação das espécies reativas com os componentes do alimento

1 - Lipídio – Os lipídios insaturados são facilmente oxidados pelas espécies reativas oriundas do oxigênio:

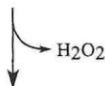
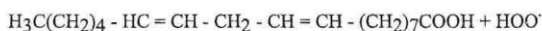
- *Peróxido de hidrogênio*: Não está diretamente envolvido na iniciação da oxidação em razão de seu baixo potencial de redução (320 mV), comparado com 600 mV dos ácidos graxos insaturados. Entretanto, o peróxido de hidrogênio pode estar implicado indiretamente na oxidação, por ser precursor da formação do radical hidroxil, o qual é um forte iniciador da reação de oxidação (eq. 1.24).

eq. 1.24



- *Ânion superóxido*: O seu baixo potencial de redução (940 mV) não é suficientemente forte para remover o hidrogênio de ácidos graxos insaturados. Somente as espécies reativas oriundas do oxigênio com o potencial de redução maior que 1.000 mV, são termodinamicamente capazes de oxidar os ácidos graxos insaturados (600 mV).

- *Radical hidroperoxil*: O seu potencial de redução (1.060 mV) é maior que o do ânion superóxido, portanto é mais reativo. Remove hidrogênio somente de lipídios polinsaturados (linoléico, linolênico e araquidônico) formando radicais alquil ($\text{R}\cdot$). O radical hidroperoxil não reage com o oléico (Figura 1.14).



13 - radical

9 - radical

Figura 1.14 - Formação do radical alquil pela reação entre o radical peroxil e ácido linoléico.

Na presença do radical peroxil, pode também remover o hidrogênio do peróxido formando novo radical peroxil (Figura 1.15).

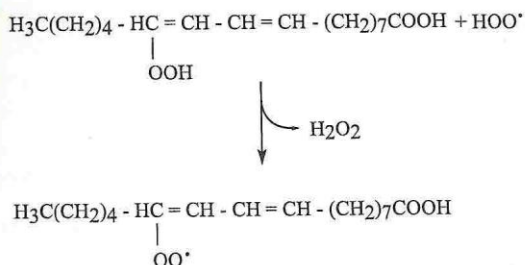


Figura 1.15 - Reação entre o peróxido do ácido linoléico e o radical peroxil.

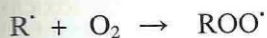
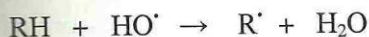
- *Radical peroxil*: Com o potencial de redução de 1.000mV, são ótimos agentes oxidantes. Aceleram a oxidação de lipídios pela remoção do hidrogênio de outras moléculas de menor potencial de redução. O radical lipídio formado desta reação interage com o oxigênio tripleto formando outro radical peroxil (eq. 1.25).

eq. 1.25

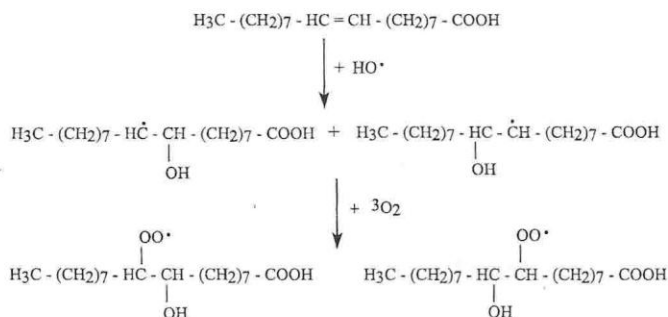


- *Radical hidroxil*: Espécie eletrofílica com elevado poder oxidante (2.300 mV), capaz de iniciar a reação de oxidação de lipídio. Remove o hidrogênio da vizinhança da insaturação, formando radical livre que, posteriormente, reage com o oxigênio tripleto propagando a formação de novos radicais livres (eq. 1.26). Alternativamente, pode-se adicionar diretamente à insaturação formando o ácido graxo radical hidroxilado (eq. 1.27), e esse radical formado, por sua vez, reage com o oxigênio tripleto formando o radical peroxil hidroxilado, propagando a reação de oxidação de lipídio.

eq. 1.26



eq. 1.27



- *Oxigênio singlete*: O oxigênio singlete pode atacar diretamente a insaturação do ácido graxo insaturado, com a formação de hidroperóxido trans, pela alteração na posição da ligação dupla durante a reação. A velocidade da reação do oxigênio singlete com os ácidos graxos oléico, linoléico e linolênico não difere grandemente, enquanto o número de insaturação do ácido graxo apresenta efeito importante na reação de oxidação com o oxigênio tripleto (p. 37).

- *Radical alcóxil*: O radical alcóxil com elevado potencial de redução (1.600 mV) também é capaz de iniciar a reação de oxidação de lipídios. A decomposição homolítica da ligação oxigênio-oxigênio do hidroperóxido forma o radical alcóxil. A adicional ruptura homolítica da ligação carbono-carbono do radical alcóxil leva a formação de aldeídos, ácidos, álcoois e hidrocarbonetos de cadeia curta (p. 43).

2 - Colesterol – A velocidade da oxidação do colesterol pelas espécies reativas oriundas do oxigênio é relativamente baixa comparada com os ácidos graxos polinsaturados contendo fosfolipídio.

- *Oxigênio singlete*: A reação entre o oxigênio singlete e o colesterol produz quatro hidroperóxido: 5 α -OOH (5-hidroperóxido), 5 β -OOH (5-hidroperóxido), 6 α -OOH (6-hidroperóxido) e 6 β -OOH. Esses hidroperóxidos são adicionalmente degradados.

- *Radical hidroxil*: Remove o hidrogênio da molécula do colesterol (C-7), formando radicais, os quais podem subsequentemente formar hidroperóxidos, principalmente o 7 α - e 7 β -OOH. Os produtos oriundos da oxidação do colesterol são importantes classes de substâncias tóxicas.

3 - β -caroteno – Reage com os radicais peróxil, hidroxil e oxigênio singlete com perdas de sua coloração característica.

- *Radical peroxil*: O radical peroxil pode tanto remover o hidrogênio formando o radical caroteno ($\text{Car}^\cdot$), ou pode ser adicionado ao β -caroteno. O potencial de redução do β -caroteno e do radical peroxil é de 542 e 1.000 mV, respectivamente. A remoção contínua do hidrogênio e a incorporação subsequente do oxigênio levam a formação de compostos carbonílicos e epóxidos (Figura 1.16).

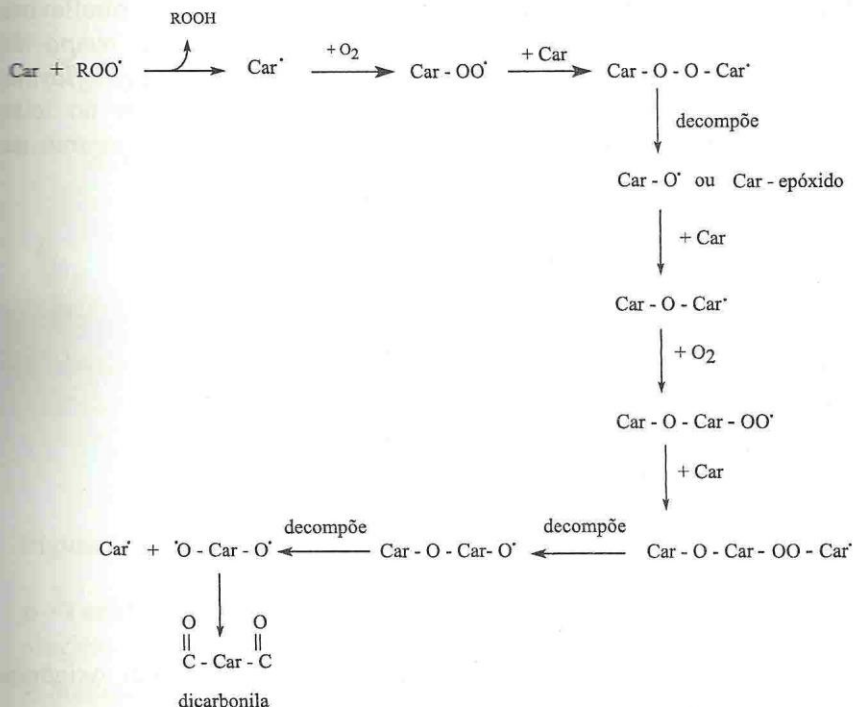


Figura 1.16 - Oxidação do β -caroteno pelo radical peroxil via caroteno radical.

- *Radical hidroxil*: O β -caroteno reage com o radical hidroxil formando o radical caroteno ($\text{Car}^\cdot$), o que em razão da deslocalização de elétrons em sua estrutura é estável. Interage com outros radicais e não com o oxigênio triplete, formando produtos não-radicaís (eq. 1.28).



eq. 1.28

- *Ânion superóxido*: Com o ânion superóxido, forma-se o deidroácido ascórbico pela remoção do próton e água oxigenada. O deidroácido ascórbico é instável e se decompõe em ácido oxálico e ácido treônico.
- *Radical hidroxil*: Oxida o ácido ascórbico formando o deidroácido ascórbico pela remoção do hidrogênio (Figura 1.19).

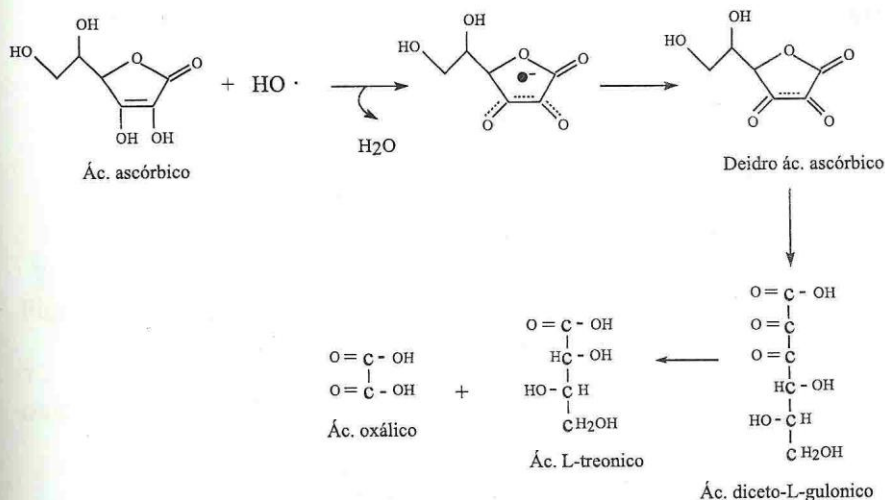


Figura 1.19 - Oxidação do ácido ascórbico pelo radical hidroxil.

6 - Tocoferóis – São oxidados pelo radical peroxil e pelo oxigênio singlete.

- *Radical peroxil*: Os tocoferóis transferem o átomo de hidrogênio da hidroxila do anel na posição 6 para o radical peroxil, formando o hidroperóxido e o radical tocoferil ($\text{T}\cdot$), o qual é estável em razão de sua estrutura ressonante (Figura 1.20).

Esta reação diminui a velocidade de oxidação de lipídios competindo com radical peroxil pelos lipídios insaturados. Considerando o potencial de redução do radical peroxil de 1.000 mV, espera-se que a reação com os tocoferóis com potencial de redução de 500 mV ocorra de forma mais rápida que com os lipídios insaturados com potencial de redução de 600 mV. O radical tocoferil formado pode reagir com o radical peroxil formando tocoferol quinona ou reagir com outro radical formando tocoferol dímero.

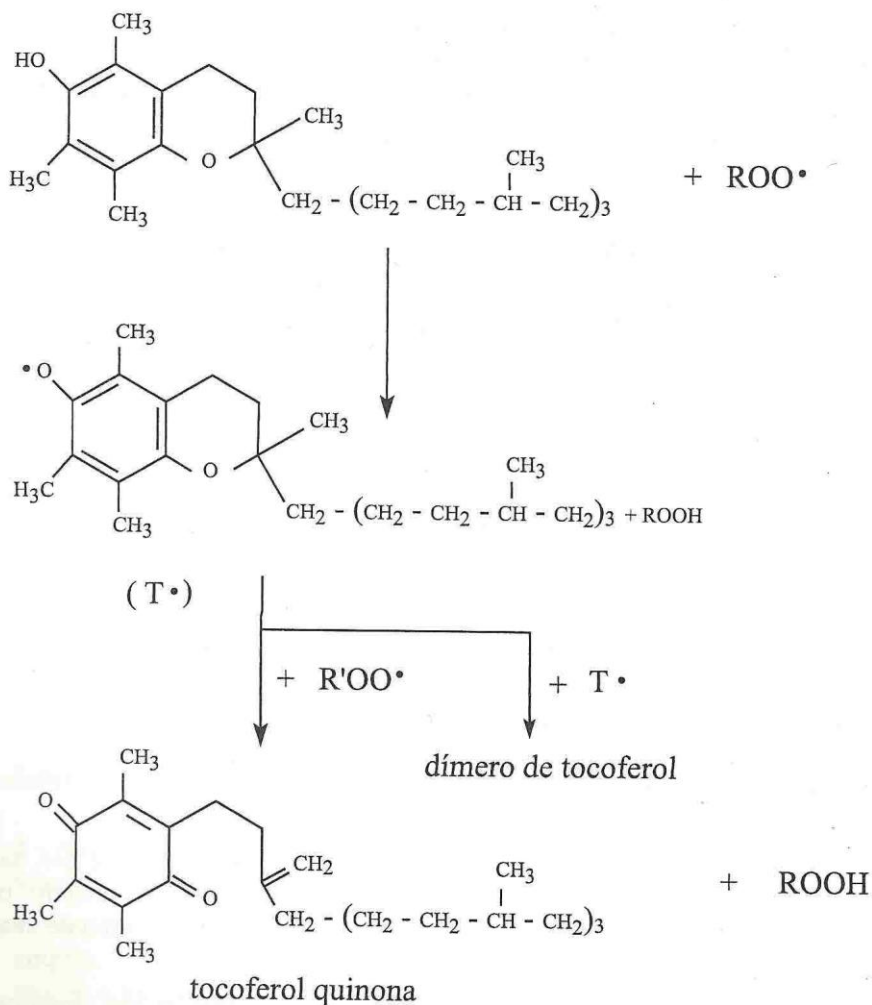


Figura 1.20 - Reação do tocoferol com o radical peróxil.

- *Oxigênio singlete*: O tocoferol reage de forma irreversível com o oxigênio singlete formando a peroxidienona, quinona e epóxido (Figura 1.21). A velocidade da reação depende do tipo da estrutura, sendo a do α -tocopherol a mais elevada, seguido do β -, γ - e δ -tocopherol.

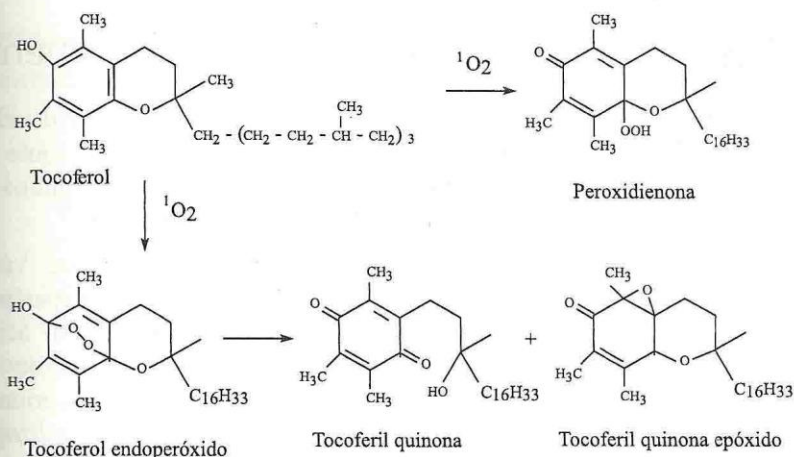


Figura 1.21 - Oxidação do tocoferol pelo oxigênio singlete.

7 - Vitamina D – A vitamina D com potencial de redução de 650 mV é oxidada pelo oxigênio singlete formando epóxido (Figura 1.22).

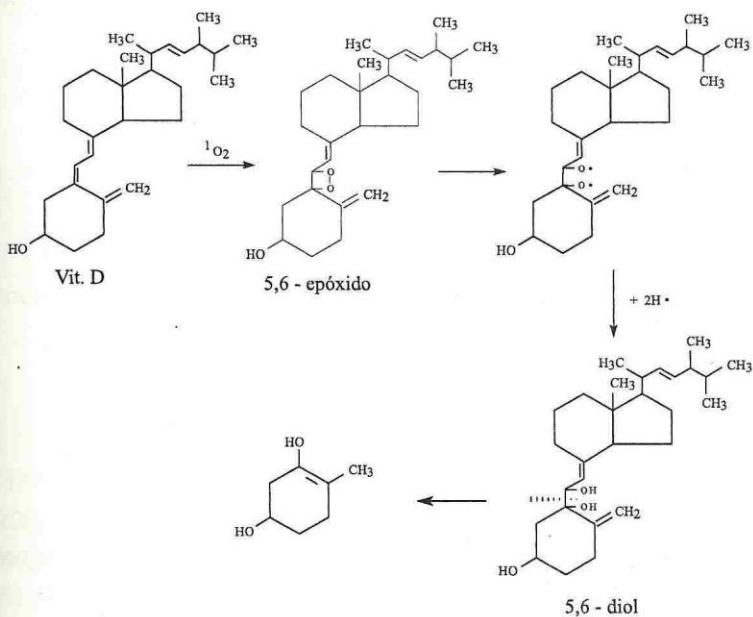


Figura 1.22 - Oxidação da vitamina D pelo oxigênio singlete.

Oxidação de Lipídios Durante o Processamento

A ocorrência de lipídios em animais e vegetais pode ser dividida em duas classes: triglicerídios (depósito), utilizados como fonte de energia, e membranas (fosfolipídios, esteróis, esfingolipídios e glicolipídios). Ambas participam da deterioração dos alimentos.

No processo de refino de óleos vegetais comestíveis, vários componentes menores são removidos com o intuito de melhorar a aparência, odor, sabor e estabilidade do produto. Estas substâncias incluem ácidos graxos livres, fosfolipídios, carboidratos, proteínas e produtos de sua degradação, água, pigmentos (carotenóides e clorofila) e produtos oriundos da oxidação de lipídios. As etapas de refino são: *degomagem*, *neutralização*, *branqueamento*, *desodorização* e, às vezes, *hidrogenação*.

1) Degomagem ácida com H_3PO_4

Remoção de:

- fosfolipídios
- proteínas
- amido
- traços de metais

Formação de:

- ésteres de ácido fosfórico
- ácidos graxos livres
- ácido fosfórico

2) Neutralização com $NaOH$

Remoção de:

- ácido fosfórico
- fosfolipídios
- compostos fenólicos
- traços de metais

Formação de:

- sabão
- diglicerídios
- água

3) Branqueamento com argila ativada

Remoção de:

- pigmentos (clorofila, caroteno etc.)
- fosfolipídios
- peróxidos
- traços de metais
- sabão
- ácido fosfórico

Formação de:

- ácidos graxos trans
- cetonas e aldeídos
- ácidos graxos livres
- dímeros e polímeros
- traços do adsorvente

4) Desodorização (180 °C a 260 °C)

Remoção de:

- ácidos graxos livres
- carotenóides
- aldeídos e cetonas
- outros voláteis
- pesticidas
- hidrocarbonetos

Formação de:

- dímeros e polímeros
- ácido graxo trans
- cores

Diversas substâncias naturais com propriedades antioxidantes são extraídas, especialmente durante a remoção dos fosfolipídios na etapa de *degomagem*. Nesta etapa, H_3PO_4 e água são adicionados para decompor os sais de fosfolipídios e transformá-los para a forma insolúvel em lipídios. As gomas formadas são, então, removidas por centrifugação.

Na etapa seguinte, *tratamento alcalino*, os ácidos graxos livres são removidos, utilizando-se solução aquosa de NaOH ou Na_2CO_3 . Os ácidos neutralizados são, então, eliminados pela lavagem com água quente. O sabão residual, além de outras impurezas, como pigmentos naturais (caroteno e clorofila), é adsorvido pela argila ativada ou pelo carvão e removido durante o processo de branqueamento.

A última etapa de refinamento é a *desodorização*, que consiste no tratamento com vapor aquecido à temperatura de 220-250 °C e à pressão reduzida de 1,0 Kpa, ou menos, para se removerem os voláteis (aldeídos, cetonas, peróxidos). Ainda nesta etapa, os teores de tocoferóis, esteróis e de pesticida são reduzidos. Com a utilização da temperatura elevada ocorre a polimerização do óleo. O teor de insaturação diminui durante as reações de polimerização, resultando na diminuição de ácidos graxos polinsaturados.

Óleos/gordura

Como em outras reações químicas, a velocidade da oxidação aumenta com a temperatura. A indução térmica das reações de oxidação ocorre em ambos os lipídios (saturados e insaturados) à temperatura utilizada nos processos de frituras. A fritura é um processo de imersão do produto em óleo aquecido à temperatura entre 150 e 190 °C. O tempo de fritura, área superficial do alimento, teor de umidade do alimento e o tipo de óleo utilizado influencia a sua absorção pelo produto. A maioria dos voláteis evapora-se juntamente com o vapor, e o remanescente é absorvido pelo alimento ou é adicionalmente modificado por meio de reações químicas.

Os compostos não-voláteis presentes alteram as propriedades químicas e físicas do óleo e do alimento. A fritura (Figura 1.23) acarreta diversas alterações no óleo: *diminuição dos ácidos graxos insaturados presentes no óleo aumenta a formação de espuma, coloração, viscosidade, densidade, teor de ácidos graxos livres, de substâncias polares e compostos poliméricos.*

Essas alterações resultam em uma série de mudanças físicas, algumas facilmente observadas:

- 1 - Formação de espuma: relacionada com a formação de polímeros.

2 - Aumento da viscosidade e densidade: consequência das reações de polimerização.

3 - Variação das características organolépticas: determinadas pelo desenvolvimento de sabor e odor típicos de óleo/gordura aquecidos em temperatura elevada.

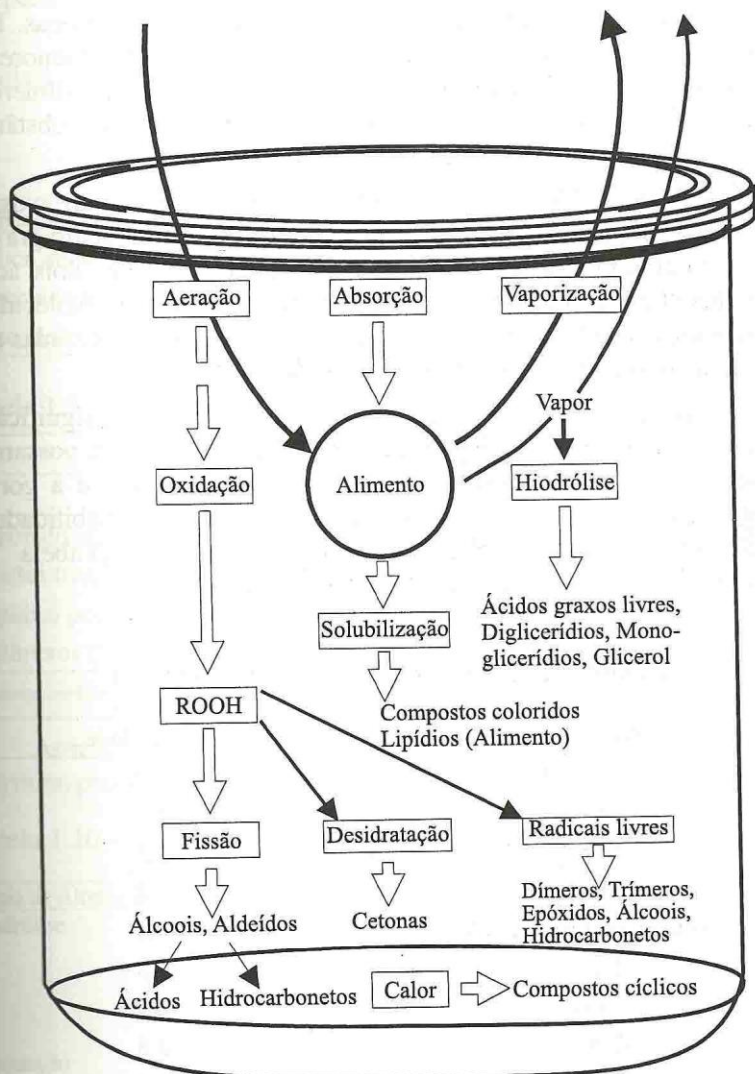


Figura 1.23 - Transformações químicas no óleo durante a fritura.

4 - Escurecimento atribuído à presença de compostos carbonílicos insaturados ou a compostos de natureza não-polar oriundos do alimento solubilizado no óleo/gordura.

5 - Diminuição do ponto de fumaça: relacionada à queima de ácidos graxos livres.

6 - Formação de peróxidos, epóxidos, hidróxidos e cetonas. Estas substâncias podem ainda ser fragmentadas em moléculas menores ou permanecer como tal, interligando-se, com formação de dímeros e polímeros. Tais produtos oxidados são classificados como substâncias voláteis, monoméricas e poliméricas.

7 - Novas ligações carbono-carbono na ausência do oxigênio podem ser formadas. Se estas ligações ocorrem no mesmo ácido graxo, o produto final será o ácido graxo cíclico e a ligação entre dois ácidos graxos resultará na formação de dímeros, tanto na mesma molécula do triacilglicerol ou entre duas moléculas. Adicionais ligações cruzadas entre essas moléculas formam polímeros de alto peso molecular.

A gordura saturada é mais estável, muito embora significantes produtos oriundos de sua degradação oxidativa e termolítica possam ser formados. Os óleos insaturados degradam-se rapidamente, e a gordura hidrogenada o faz em menor extensão. Portanto, a estabilidade ao aquecimento difere nos vários tipos de óleo/gordura (Tabela 1.7), aumentando com a hidrogenação das ligações duplas.

Tabela 1.7 - Estabilidade relativa de óleos/gorduras à fritura

Óleo/gordura	Estabilidade
Girassol	1,0
Soja	1,0
Soja hidrogenada	2,3
Amendoim	1,2
Amendoim hidrogenado	4,4
Dendê	1,5
Porco	2,5
Manteiga	2,3
Coco	2,4

A combinação de calor, ar, luz, umidade e fragmentos do produto que está sendo aquecido contribuem para sua oxidação, alterando substancialmente suas propriedades químicas e físicas (Tabelas 1.8 e 1.9). Por exemplo, as reações envolvendo as ligações duplas provocam diminuição no índice de iodo, e a reação de formação de compostos de alto peso molecular altera a viscosidade.

Tabela 1.8 - Alterações químicas no óleo de algodão aquecido a 225 °C

	Tempo (horas)		
	0	72	194
Índice de iodo	110	91	73
Índice de peróxido	2,5	1,5	0,0
Viscosidade (poise)	0,6	2,1	8,1
Peso molecular (médio)	850	1.080	1.510

Tabela 1.9 - Alterações no óleo de girassol durante a fritura de batata

	Tempo (horas)		
	0	12	72
Peróxido (meq/kg)	1-8	18-45	22-120
Acidez (mg/g)	0,05-0,10	1,2-1,4	1,8-2,2
Lipídios polares*(%)	1-4	4-10	8-16
Polímeros (%)	0,1-0,3	0,4-1,8	3,0-4,6

* Monoglicerídios, diglicerídios, AGL e outros.

As reações de *hidrólise*, *oxidação* e *polimerização* são comuns no óleo de fritura, produzindo compostos voláteis e não-voláteis (Tabela 1.10).

Tabela 1.10 - Alterações do óleo/gordura durante a fritura

Tipo de Alteração	Agente	Compostos Resultantes
Hidrólise	Umidade	Ácidos graxos Monoglicerídios Diglicerídios Glicerol
Oxidação	Oxigênio	Monômeros cíclicos, polímeros, voláteis (aldeídos, ácidos, hidrocarbonetos, cetonas, álcoois etc.)
Alterações térmicas	Temperatura	Monômeros cíclicos, dímeros e polímeros

1 - *Hidrólise do óleo*. Quando o alimento é aquecido no óleo, a sua umidade é liberada na forma de vapor. As reações químicas no óleo de fritura e no alimento pela ação da água, vapor e oxigênio são então iniciadas. A água é um nucleofílico fraco e ataca as ligações éster do triacilglicerol formando di- e monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos livres (Figura 1.23).

O teor de ácido graxo livre no óleo de fritura aumenta com o número de frituras com conseqüente diminuição de seu ponto de fumaça. Portanto, o índice de acidez é utilizado para monitorar a qualidade do óleo. Os peróxidos formados nessas condições são imediatamente fragmentados; portanto, a determinação do índice de peróxido para avaliar a qualidade do óleo/gordura não é o método apropriado.

A hidrólise ocorre preferencialmente em óleos contendo ácidos graxos de cadeia curta e insaturado (são mais hidrosolúveis) que aqueles contendo ácidos graxos de cadeia longa e saturada. Elevada quantidade de água promove a hidrólise do óleo rapidamente, sendo mais eficiente que o vapor. Os produtos resultantes da hidrólise (di- e monoglicerídeos, glicerol e ácidos graxos livres) aceleram a reação de hidrólise. O glicerol evapora a temperatura de 150 °C e o remanescente no óleo promove a hidrólise liberando ácidos graxos livres.

2 - *Oxidação do óleo*. O mecanismo da oxidação térmica é idêntico à autooxidação, mas a velocidade da reação é maior. O triglicerídio no estado singlete não reage com o oxigênio di-radical triplete (Figura 1.5) em razão do conflito básico existente da conservação do spin. O oxigênio do ar é um composto di-radical e, portanto, requer o triglicerídio na forma de radical para que ocorra a reação de oxidação. Por isso, para que esta reação ocorra, é necessário remoção do hidrogênio localizado no carbono do ácido graxo insaturado contendo a ligação mais fraca (Figura 1.4), para se tornar então radical. O calor, luz, metais e espécies reativas oriundas do oxigênio facilitam a formação de radicais no óleo.

A ligação covalente oxigênio-oxigênio presente no hidroperóxido ($R-O-O-H$) é relativamente fraca (44 Cal/mole), portanto, não são estáveis e se degradam durante a operação de fritura (Tabelas 1.8 e 1.9). São decompostos para radicais *alcoxil* e *hidroxil* pela homólise da ligação peróxido. Os radicais alcoxil podem interagir entre-se ou decomposto formando produtos não-radicais.

A quantidade de compostos voláteis presentes no óleo depende do tipo de óleo, do alimento e das condições de fritura. O desaparecimento ou perdas de compostos voláteis durante a fritura é devido à combinação da evaporação e decomposição, bem como reações com outros componentes presentes no alimento. Os voláteis podem ser adicionalmente oxidados, dimerizados e polimerizados. A velocidade das reações de degradação aumenta com o aumento da concentração de oxigênio e de radicais livres.

3 - Reações de polimerização. Os principais produtos da decomposição do óleo de fritura são os compostos polares não-voláteis, dímeros e polímeros de triglicerídios. A quantidade de compostos cíclicos é relativamente pequena em comparação com os compostos polares não-voláteis, dímeros e polímeros (Tabela 1.11).

Aumentando-se o número de frituras e da temperatura, aumenta também a quantidade de polímeros formados (Tabela 10). Estes, sendo ricos em oxigênio, promovem adicional oxidação do óleo, aumento na viscosidade, diminui a transferência de calor, produção de espuma, aumenta a absorção do óleo pelo alimento e desenvolve coloração indesejável no alimento.

Tabela 1.11 - Formação de polímeros de triacilglicerol (mg/100 mg óleo) em óleo de girassol durante repetidas frituras de batata

	Número de frituras				
	0	20	30	50	75
Polímero triglicerídio	0,10	1,65	2,50	3,15	3,44
Dímero triglicerídio	0,75	6,25	7,0	7,37	7,51

Os dímeros e polímeros são moléculas de alto PM contendo ligações - C - C -, - C - O - C - (ligação éter) e - C - O - O - C - (ligação peróxido), podendo ser cíclicos ou acíclicos dependendo da reação e tipos de ácidos graxos envolvido (Figura 1.24 e 1.25).

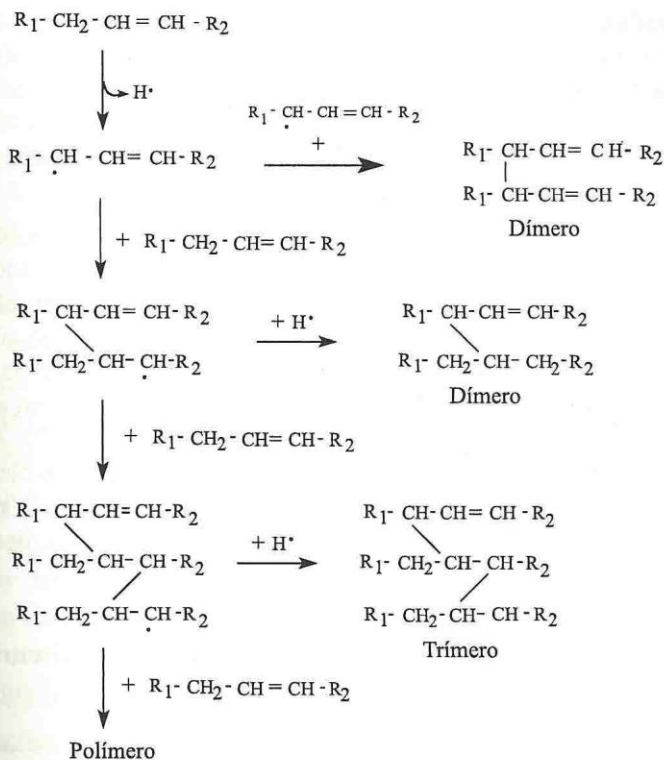


Figura 1.25 - Formação de polímero acíclico do ácido oléico durante fritura.

Fatores que afetam a qualidade do óleo durante a fritura

1 - Incorporação de óleo novo ao de fritura: a incorporação freqüente (15 a 25%) no óleo de fritura diminui a formação de compostos polares, glicerídeos e ácidos graxos livres; portanto, aumenta a sua utilização.

2 - Tempo e temperatura de fritura: o tempo de utilização aumenta o teor de ácidos graxos livres, compostos polares e triglicerídeos oxidados. Temperatura elevada acelera a oxidação térmica e a polimerização do óleo contendo ligações éter ($-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$) e diminui a formação de polímeros contendo ligações peróxido ($-\text{C}-\text{O}-\text{O}-\text{C}-$). O aquecimento e resfriamento intermitente do óleo provocam deterioração mais acentuada que o aquecimento contínuo, devido à solubilidade do oxigênio que aumenta no óleo quando este é resfriado.

3 - *Qualidade do óleo de fritura*: a presença de ácidos graxos livres e o grau de insaturação aceleram a oxidação térmica do óleo. O óleo de milho, por exemplo, é melhor para ser utilizado em frituras que o de soja e canola, pois é menos insaturado que ambos (Tabela 1.2). O teor de ácido linolênico é crítico em frituras, em razão da estabilidade do óleo e do aparecimento de *flavor* indesejável no alimento frito.

A utilização do óleo hidrogenado (Tabela 1.7) aumenta sua estabilidade; entretanto este processo, além de produzir ácidos graxos trans, confere *flavor* metálico. A mistura de diversos tipos de óleo com o objetivo de alterar a sua composição, ou seja, a filtração do óleo usado com o objetivo de diminuir ácidos graxos livres, diminui o processo oxidativo durante a fritura. Óleos utilizados em frituras devem apresentar baixos níveis de ácidos graxos livres e peróxido (Tabela 1.12). Alimentos com elevado teor de umidade, provocam intensa hidrólise do óleo durante a fritura. Metais de transição como o ferro, presentes na carne, acumulam-se no óleo aumentando a velocidade da oxidação, bem como a degradação térmica.

Tabela 1.12 - Especificação de óleo/gordura utilizado em fritura

Parâmetros	Níveis
Ácido graxo livre	0,05 – 0,08%
Índice de peróxido	1,0 meq/kg
Ponto de fumaça	200 °C
Umidade	0,10%

4 - *Antioxidantes*: os antioxidantes sintéticos (BHA, BHT, PG e TBHQ) diminuem a velocidade da oxidação do óleo à temperatura ambiente. Entretanto, tornam-se menos efetivos à temperatura elevada em razão das perdas por volatilização ou decomposição. A quantidade de oxigênio dissolvido no óleo acelera a sua decomposição. O borbulhamento com nitrogênio durante 15 minutos ou dióxido de carbono por 5 minutos antes do aquecimento diminui o oxigênio dissolvido e reduz a oxidação durante o procedimento de fritura. O dióxido de carbono oferece melhor proteção em virtude de sua elevada solubilidade e densidade que o nitrogênio.

Esta operação envolve a adição de hidrogênio à insaturação presente no ácido graxo, tornando possível alterar o seu estado físico, ou seja, converte óleo líquido em semi-sólido, além de torná-lo mais estável à oxidação (reduz o número total de insaturações). Algumas das ligações duplas presentes originalmente no óleo na configuração *cis* são isomerizadas para a forma *trans* e podem ser deslocadas de sua posição original ao longo da cadeia de hidrocarbonetos, originando diversos isômeros posicionais (Tabela 1.13).

Os ácidos graxos *trans* possuem ponto de fusão mais elevado que o correspondente na forma *cis*. A forma *cis* apresenta estrutura dobrada, enquanto a forma *trans* é mais linear, similar às estruturas dos ácidos graxos saturado. A principal fonte de ácidos graxos *trans* na alimentação (90-95%) é a hidrogenação comercial de óleos vegetais. Uma segunda fonte ocorre em alimentos oriundos de ruminantes resultantes da bioidrogenação no rúmen destes animais (leite, carne e derivados).

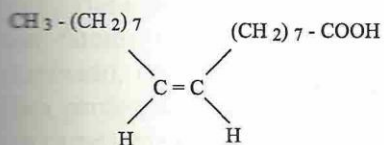
Na prática, o óleo é inicialmente misturado com catalisador adequado (geralmente o níquel finamente moído, 0,05 – 0,20%), aquecido à temperatura de 140-225 °C em tanques fechados e exposto durante a agitação ao hidrogênio à pressão de 60 psig. O progresso da reação de hidrogenação é monitorado determinando-se alterações no índice de refração, o qual está relacionado com o grau de saturação do óleo. Quando se atinge o ponto final desejado, o óleo hidrogenado é resfriado e o catalisador é removido por filtração.

O produto final ainda possui 50-85% de ácidos graxos insaturados (Tabela 1.13). O óleo vegetal é seletivamente hidrogenado para se obter elevado grau de isomerização *cis-trans*, retendo-se máxima quantidade de ácido oléico e linoléico. O produto solidifica a temperatura baixa desejável. A margarina, contrário à crença popular, possui muito pouco ácido graxo saturado e elevada percentagem de ácidos graxos *trans*.

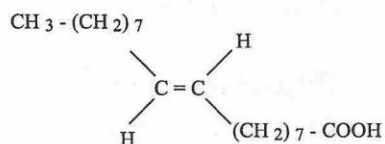
Tabela 1.13 - Alterações na composição de ácidos graxos durante a hidrogenação do óleo de soja

Ácido graxo	Óleo original	Óleo hidrogenado
Palmítico	6 - 10	6 - 10
Estearico	2 - 4	3 - 16
Oléico (cis)	22 - 32	28 - 48
(trans)	-	22 - 48
Linoléico (cis-9, cis-12)	50 - 60	5 - 24
(cis-9, trans-12) + (trans-9, cis-12)	-	2 - 8
(cis-9, trans-12) + (trans-8, cis-12)	-	4
Linolênico	2 - 5	0 - 2

A formação de ácidos graxos trans é favorecida pelo uso de alta concentração de catalisador e temperaturas elevadas no processo. O oléico (18:1 cis-9) forma o isômero trans elaídico (18:1 trans-9) durante a hidrogenação parcial de óleos vegetais. A Figura 1.26 mostra que o ácido graxo trans possui dois átomos de hidrogênio em lados opostos à dupla ligação, e a configuração cis possui os dois hidrogênios do mesmo lado. Esta pequena alteração possui conseqüências significativas no formato do ácido graxo, afetando suas propriedades físicas.



Ácido oléico (18:1 cis-9)
PF = 14 °C



Ácido elaídico (18:1 trans-9)
PF = 43,7 °C

Figura 1.26 - Estruturas do ácido oléico e elaídico.

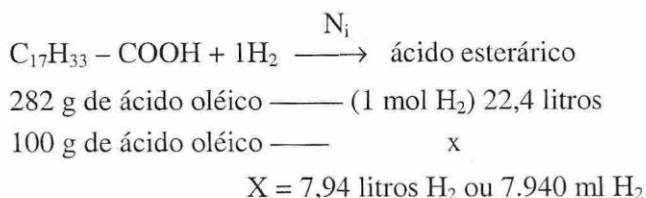
Os ácidos graxos trans não são biologicamente equivalentes ao seu isômero cis, e o conhecimento científico de suas propriedades biológicas ainda é controvertido, embora evidências consideráveis existam: aumento

de triglicerídios e do LDL e diminuição do HDL, portanto potencialmente eleva os riscos de doenças cardiovasculares.

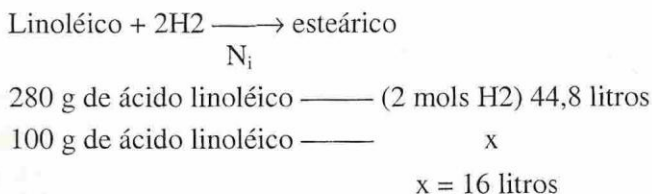
O mecanismo de hidrogenação envolve a reação entre ácidos graxos insaturados e átomos de hidrogênio adsorvidos no catalisador metálico. Inicialmente ocorre a formação do complexo carbono-metal (a insaturação é absorvida na superfície do metal) e o átomo de hidrogênio é então transferido da superfície do metal para um dos carbonos da insaturação.

O consumo de hidrogênio para promover uma completa hidrogenação pode ser calculado, conforme exemplos a seguir:

1) Quantos ml de hidrogênio seriam necessários para saturar completamente 100 g de ácido oléico puro, utilizando o catalisador níquel e hidrogênio puro? Dados: 1 mol de $H_2 = 22,4$ litros (CNTP).



2) Quantos litros de hidrogênio seriam necessários para converter 100 g do ácido linoléico para esteárico?



Carne

A principal causa da deterioração da carne é a rancidez oxidativa envolvendo a oxidação de ácidos graxos polinsaturados (Tabela 1.14). Exceto em peixe, todos os ácidos graxos altamente insaturados estão associados predominantemente aos fosfolipídios. Os lipídios do tecido adiposo da carne de boi (11 - 28% de gordura) são altamente saturados.

Na carne, constituem 2,0 a 4,0% do total da gordura e compreendem alguns fosfolipídios contendo 25% e acima de 19% de ácido graxo, respectivamente com duas ou três e quatro ou mais insaturações. São esses os responsáveis pela rancidez, especialmente pelo fato de se encontrarem muito próximo de catalisadores (heme).

Tabela 1.14 - Ácido graxo insaturado em carne

Ác. graxo	%				
	Carneiro	Boi	Porco	Frango	Peixe
C18:1	19,5	33,5	12,8	20,2	19,6
C18:2	18,5	10,5	35,1	14,2	5,8
C18:3	0,4	1,7	0,3	0,9	8,1
C20:2	0,3	0,7	-	-	0,2
C20:3	0,6	2,8	1,3	1,3	0,4
C20:4	13,2	8,5	9,5	11,6	3,8
C20:5	-	0,8	1,3	1,5	7,2
C22:4	-	0,9	1,0	2,1	0,7
C22:5	-	0,9	2,3	5,8	2,4
C22:6	-	-	2,3	5,8	2,39

Durante certas operações de processamento da carne, o equilíbrio dos fatores que controlam as reações oxidativas no tecido vivo é eliminado, ocorrendo alterações oxidativas dos componentes químicos. Essa perda provoca o rápido desenvolvimento de sabor e odor estranhos em carnes processadas.

As operações de processamento que promovem a ruptura do balanço oxidativo incluem:

- (1) Redução do tamanho das partículas, ocasionando, além da mistura de catalisadores da oxidação com a fração lipídica, a incorporação do oxigênio no tecido antes anaeróbico.
- (2) Cozimento, que, além de promover o rompimento da organização celular dos tecidos, provoca a desnaturação de proteínas, resultando na perda da atividade das enzimas antioxidantes, e a liberação do

ferro anteriormente ligado às proteínas. A desnaturação das lipoproteínas da membrana libera fosfolipídios, os quais são as principais fontes de ácido graxo polinsaturados na carne e a principal causa da deterioração do *flavor* em carnes cozidas.

- (3) Adição de sal, que aumenta a atividade catalítica do ferro e reduz a atividade das enzimas antioxidantes.

A carne crua não apresenta problema sério de oxidação, e a degradação em condições de refrigeração é devida à ação bacteriana ou enzimática. O armazenamento a 0 °C mantém a carne em boas condições por período de três a seis semanas e, sob congelamento à temperatura entre - 18 °C e - 20 °C, por 9 a 15 meses. Entretanto, a oxidação pode ocorrer com a desintegração da carne (carne moída, libera ácidos graxos insaturados dos fosfolipídios das membranas e íons Fe⁺⁺ da mioglobina, e com o congelamento e descongelamento repetido), iniciando-se a oxidação mesmo em condições de resfriamento.

Em condições de congelamento, a vida útil é determinada pelas alterações oxidativas que afetam os lipídios, as quais ocorrem em maior velocidade em carnes de aves e porco do que de boi. A carne de frango (7% de gordura) oxida mais rapidamente que a de boi, em razão do elevado teor de ácidos graxos insaturados, especialmente nos fosfolipídios. A carne de peru torna-se rancificada mais rapidamente, em virtude da maior concentração de fosfolipídios (em torno de 30 a 40% do lipídio total). A carne de porco (25-33% de gordura) possui também elevado teor de fosfolipídios (20%) altamente insaturados, além de lipídios totais, que contribuem com 50 a 60% de ácidos graxos insaturados.

Quando a carne é cozida e armazenada sob refrigeração, no período de um a três dias ocorre a perda do aroma característico e o aparecimento de *flavor* estranho (oxidado/rançoso/azedo) é comumente denominado *flavor requentado* ("warmed-over *flavor*" – WOF). O teor de alguns compostos oriundos da oxidação de ácidos graxos insaturados aumenta durante o armazenamento ou quando a carne é novamente aquecida. O hexanal formado durante a oxidação do ácido linoléico é o mais abundante entre os voláteis formados.

A oxidação dos fosfolipídios da membrana e a degradação de proteínas e compostos associados com o aroma da carne fresca cozida são responsáveis pela formação do sabor desagradável. O aquecimento libera o

ferro da mioglobina e de outras metaloproteínas que atuam como catalisadores, acelerando a reação da oxidação de fosfolipídios; transforma a mioglobina em molécula pró-oxidante; induz à decomposição de peróxido; e desnatura enzimas protetoras que atuam no controle da oxidação.

A sensibilidade de produtos de carne pré-cozida à oxidação de lipídios depende de diversos fatores. Diferença entre os vários tipos de carne pode ser explicada pela diferença de concentração de ácido graxo polinsaturado, ferro, tocoferóis e outros antioxidantes. As carnes de peru e frango oxidam rapidamente em razão de sua alta concentração de ácidos graxos polinsaturados. A carne escura é ainda mais sensível, em face de seu alto teor de fosfolipídios e ferro. A carne de peru oxida mais rapidamente que a de frango, pois contém baixos níveis de alfa-tocoferol.

A suplementação de vitamina E na dieta eleva os níveis de alfa-tocoferol na membrana celular, especialmente na mitocôndria e nos microssomos, resultando em significativa diminuição na sensibilidade à oxidação de lipídios nas membranas. A presença de fosfolipídios altamente insaturados na mitocôndria e nos microssomos é responsável pelo *flavor* requeentado, e a incorporação do alfa-tocoferol via dieta na membrana efetivamente reduz o aparecimento do *flavor* requeentado em produtos pré-cozidos.

Peixe

O óleo de peixe possui poucos ácidos graxos saturados (14:0, 16:0 e 18:0) e grande número de insaturados contendo 16 a 22 carbonos com até 6 insaturações, em configuração exclusivamente na forma *cis*. A composição de ácidos graxos de alguns peixes de água doce e salgada são mostrados na Tabela 1.15. O elevado teor de ácidos graxos polienólicos torna o óleo de peixe muito sensível à oxidação, dando origem a formação de *flavor* desagradável além de compostos indesejáveis tais como radicais livres e aldeídos reativos. O índice de iodo é em torno de 170-195, indicativo de elevada insaturação.

O teor de óleo e, ou, gordura em peixe é muito variável, sendo também influenciado pelo tipo, idade, estação do ano e disponibilidade de alimentação. Tipicamente, contém grandes quantidades de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa. Seu elevado teor de ácidos graxos polinsaturados contendo quatro a seis insaturações e o baixo teor de tocoferol torna sua conservação difícil em condições de refrigeração.

Tabela 1.15- Composição aproximada (%) dos principais ácidos graxos em alguns peixes de água doce e salgada

	14:0	16:0	18:0	16:1	18:1	20:1	22:1	18:2n6	18:3n3	20:4n6	20:5n3	22:6n3
Arenque	6,4	12,7	1	9	12,7	14	21	1	0,6	0,3	8,4	5
Bacalhau	1,5	20	4	3,5	4	3	1	0,7	T	2,5	17	30
Linguado	4,3	16,5	2,5	14,5	12	4	-	0,3	2	4	12	7
Sardinha	6	10	2	13	24	3,2	14	1,3	1	1,6	17	13
Salmão	6,3	19,2	3,3	6,2	17,3	3,3	6,6	1,2	1,3	1,3	8,2	2,5
Camarão	2	16	2,6	6	19	2,4	1,6	1,5	1,4	0,4	22	6
Lagosta	1	11,6	3,3	5,5	18	3	2	2	2	3	26	12
Carpa	3	17	4,3	17	28,3	4	-	13,2	2,3	2,5	3,2	-
Truta	2,7	21	8,3	4	18,4	-	-	7,3	1,6	1,7	5,8	7
Bagre	1	15,2	4	3	30	1	-	10	0,5	0,8	T	0,6

A maioria dos peixes comercializados possui baixo teor de lipídios (< 5,0%), porém o grau de insaturação é muito maior que em carnes, tornando-os muito mais sensíveis à oxidação. Os peixes oriundos do mar são mais sensíveis que os de água doce, por apresentarem elevados teores de ácidos graxos polinsaturados. Diferenças do tipo de músculo afetam também as características oxidativas. A carne escura (1,8 a 2,2% de lipídios) possui elevada concentração de grupos heme em comparação com a carne branca (0,6 a 0,75% de lipídios), portanto oxida mais rapidamente que esta.

Em condições normais de armazenamento na temperatura acima de 0 °C, o crescimento bacteriano inibe a oxidação de lipídios, sendo responsável pela deterioração. A oxidação de lipídios torna-se significativa abaixo de 0 °C. O desenvolvimento da rancificação em peixes congelados depende da temperatura e da espécie. A oxidação de lipídios e a hidrólise dos fosfolipídios ocorrem rapidamente entre 0 °C e -18 °C, com o máximo a -4 °C. Abaixo de -18 °C, a velocidade da oxidação é menor (Tabela 1.16).

Tabela 1.16 - Vida útil em condições de congelamento

	Vida útil (meses)		
	-18 °C	-25 °C	-30 °C
Peixe gorduroso (> 5,0% de lipídio)	4	8	12
Peixe não-gorduroso (< 5,0% de lipídio)	8	18	24
Lagosta, camarão	6	12	15
Caranguejo	6	12	12
Ostra	4	10	12

Leite e derivados

A gordura do leite é quase que totalmente constituída de triglicerídios (99%); apresenta-se na forma de glóbulos, sendo revestida por uma membrana (Figura 1.27) e composta de fosfolipídios e proteínas. O triglicerídio possui significativa quantidade de ácidos graxos saturados de cadeia curta, enquanto os fosfolipídios apresentam também baixo teor de ácidos graxos insaturados (6%). Embora os principais ácidos graxos

presentes na gordura do leite sejam o palmítico, oléico e esteárico, esta diferencia-se das demais gorduras animais pela quantidade significativa de ácido graxo de cadeia curta (C_4 a C_{12}) que apresenta (Tabela 1.17).

O leite possui 3,5% de gordura (queijo ~34% e manteiga ~80%), ressaltando-se que os ácidos graxos saturados representam ~60% do total presentes no leite. Em particular, os ácidos graxos de cadeia curta, *butírico* ($C4:0$), *capróico* ($C6:0$), *caprílico* ($C8:0$) e *cáprico* ($C10:0$) são abundantes (8 a 10%) na gordura do leite de ruminantes. O índice de iodo (II) na gordura do leite está na faixa de 30-35, indicativo de elevada saturação. Os ácidos graxos de cadeia curta são responsáveis pelas características do *flavor* e aroma, podendo contribuir tanto pelo aroma desejável de alguns tipos de queijos ou indesejável *flavor* rançoso.

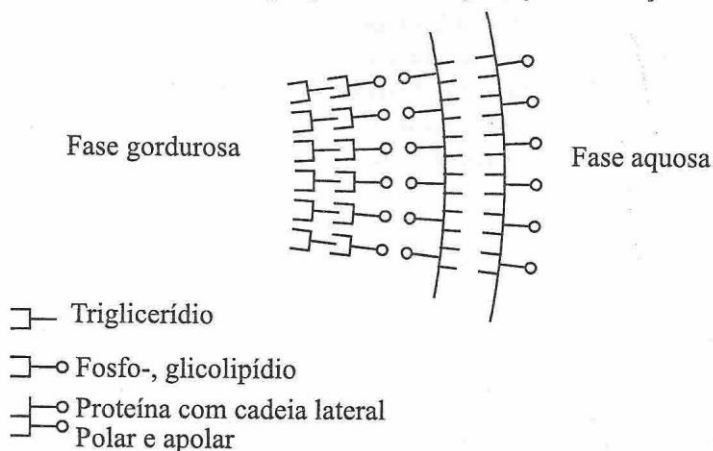


Figura 1.27 - Estrutura dos glóbulos de gordura.

Em torno de 40% do total de ácidos graxos consiste dos saturados ácido palmítico ($C16:0$) e esteárico ($C18:0$), e os demais saturados são o láurico ($C12:0$) e mirístico ($C14:0$). Entre os insaturados, o ácido oléico ($C18:1$) é abundante (aproximadamente 30% do total), mas a porcentagem pode variar com a alimentação do animal. O nível de ácidos graxos polinsaturados é baixo: 2,6% para o linoléico ($C18:2$) e 1,7% para o linolênico ($C18:3$). O tratamento UHT aumenta os níveis de ácidos graxos livres no leite e, conseqüentemente, aumenta índice de acidez.

Tabela 1.17 - Composição aproximada (%) dos principais ácidos graxos em leite de vaca e cabra

Ácido graxo	Vaca	Cabra
4:0	3,6	4,8
6:0	2,0	2,3
8:0	1,3	2,7
10:0	2,6	9,5
Total cadeia curta	9,5	19,3
12:0	3,0	4,4
14:0	11,2	10,0
16:0	29,0	25,0
18:0	13,0	9,3
Total saturado	56,2	68,0
16:1	2,6	2,0
18:1	24,4	21,0
18:1t	3,0	-
Total monoinsaturado	30,0	23,0
18:2	2,6	2,3
18:3	1,7	1,0
Total polinsaturado	4,3	3,3

Em condições apropriadas de obtenção e armazenamento do leite, este pode ser mantido por diversos dias sem que ocorra a rancificação. A oxidação de modo geral não constitui problema para o leite, pelo menos até 14 dias após a pasteurização, exceto quando exposto à luz. A exposição ao sol produz *off-flavor*, supostamente em razão da oxidação de lipídios e proteínas.

No leite são encontrados potentes catalisadores da oxidação de lipídios (100 a 250 μg de ferro/g e 20 a 40 μg de cobre/kg). A integridade dos glóbulos parece ser a principal causa do efeito protetor da oxidação da gordura, além da presença de antioxidantes. O ácido ascórbico,

encontrado no leite pasteurizado em concentrações de 15,0 a 18,0 mg/L atua como antioxidante. Sua concentração diminui durante o armazenamento e desaparece uma semana após a pasteurização. O tocoferol também está presente e funciona como antioxidante. Entretanto, a maior proteção do leite à oxidação é proveniente da interação da caseína com os metais (Cu^{++} e Fe^{+++}), evitando o contato do metal com o triglicerídio.

Com a homogeneização (rompimento da membrana) e pasteurização, a oxidação de lipídios pode-se tornar problema em leite armazenado por uma semana se sua contagem bacteriana for baixa. Geralmente, o crescimento bacteriano é responsável pelo curto período de armazenamento do leite.

A oxidação da gordura do leite pode ocorrer por mecanismos fotoxidativos ou ser catalisada por íons metálicos. O complexo formado pela interação da fosfatidil etanolamina com íons metálicos facilita a formação de peróxido na interface da emulsão óleo/água. A temperatura de armazenamento de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ mantém a manteiga aceitável por período acima de cinco meses. Entretanto, se exposta à luz, a oxidação na superfície ocorre rapidamente, com aparecimento de odores.

Como esperado, o leite em pó integral contendo 25 a 30% de gordura é muito mais instável que o leite em pó desnatado. Níveis de oxigênio menores que 1,0% são necessários para se obter suficiente vida útil à temperatura ambiente. Na presença de ar ocorre o aparecimento de odores em uma semana. A estabilidade do leite em pó integral se deve à proteção dos glóbulos de gordura por uma camada de lactose, o que evita o contato do oxigênio com a gordura, além da formação de antioxidantes durante a secagem à temperatura elevada.

Em geral, a estabilidade do leite em pó integral é comprometida pela proximidade de metais com os lipídios. O leite em pó desnatado não apresenta problemas oxidativos, em virtude da remoção de lipídios durante o processamento, podendo ser armazenado em temperatura ambiente por período acima de um ano.

Cereais e derivados

Os cereais possuem relativamente baixos níveis de lipídios, embora alguns, como milho e aveia, possam conter 5 e 9% de óleo,

respectivamente. No processamento do arroz e do trigo, o produto final contém 0,8% de óleo no arroz polido e 1,5 a 2,5% na farinha de trigo. Na maioria dos cereais, o óleo é concentrado no germe e, no caso do milho (12-15%) e trigo (8-10%), este é utilizado comercialmente para extração de óleo. Os lipídios presentes no germe são os responsáveis pelos problemas de rancificação (rancidez hidrolítica e oxidativa) em cereais e derivados.

Em cereais, o primeiro estágio da degradação de lipídios é a liberação de ácidos graxos, os quais podem então participar de uma série de reações de degradação oxidativas (química ou enzimática pela lipoxigenase). Os ácidos graxos podem ser liberados enzimaticamente (lípases) ou por mecanismos químicos (saponificação).

A ação de lípases origina-se da atividade de enzimas naturalmente presente no grão ou oriunda da contaminação por microorganismos. A liberação hidrolítica de ácidos graxos pode ser elevada sem, contudo desenvolver a rancidez, em razão de inexistência de ácidos graxos de cadeia curta (Tabela 1.2). O *flavor* dos ácidos graxos livres resultantes é descrito como ácido ou de sabão. A farinha de trigo é estável se armazenada em condições adequadas de temperatura e umidade. A sua qualidade deteriora com o tempo (após 12 meses), ocorrendo perda gradual de triglicerídios e o aumento correspondente em ácido graxo livre.

Tipicamente, a farinha de trigo em boas condições possui IA ~ 11-20. A deterioração em razão do armazenamento impróprio, crescimento de fungo, elevada atividade respiratória ou aquecimento espontâneo pode aumentar a acidez acima de 100. As consequências práticas do aumento de ácidos graxos livres são: redução do volume da massa e parâmetros organolépticos. Altos níveis de ácidos graxos livres em cereais armazenados impropriamente estão associados com a elevada contaminação de fungos.

Frutas e vegetais

O teor de lipídios em frutas e vegetais é baixo (0,1 - 0,9%), sendo constituído principalmente de lipídios polares (fosfolipídios e

glicolipídios), e o processo de oxidação é amenizado pelo elevado teor de água, em razão da proteção dada pelas proteínas hidratadas – que impedem o acesso do oxigênio – e da hidratação de íons metálicos – que são insolúveis na fração lipídica. Durante a secagem e o congelamento, quando a atividade da água é menor que $a_w = 0,1$, a oxidação é acelerada e, quando a atividade da água é aumentada para $a_w = 0,3$, a oxidação é retardada (Figura 1.28). Para valores de $a_w = 0,55$ a $0,85$, a estabilidade dos lipídios pode ser comprometida pela ação das oxigenases.

Em frutas e vegetais contendo sementes com elevado teor de óleo, como tomate, ervilha, morango etc., a oxidação de lipídios é causada pelo processo de congelamento imperfeito ou pela flutuação na temperatura durante o armazenamento do material congelado. O congelamento deve ser rápido, e o armazenamento requer temperatura baixa e constante. Entretanto, enzimas lipolíticas permanecem ativas mesmo a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o ácido graxo livre liberado pode ser atacado por lipoxigenases durante o descongelamento. Assim, procedimentos que reduzam ou eliminam a atividade enzimática reduzem também a possibilidade de deterioração da qualidade do produto.

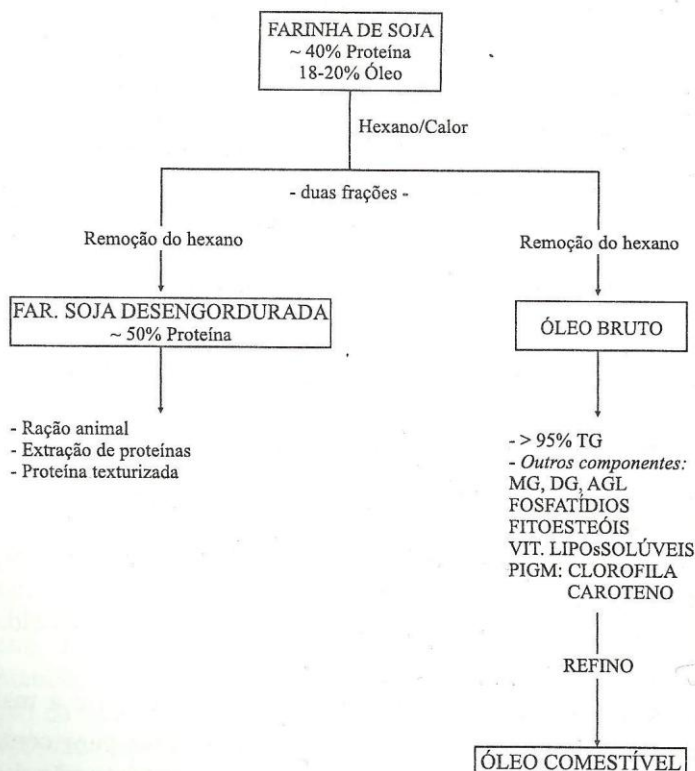
Produtos desidratados

Historicamente, a desidratação de alimentos é um procedimento utilizado no controle de microrganismos. Entretanto, se o produto é desidratado para níveis de umidade muito baixos ($a_w < 0,1$), este se torna muito sensível à oxidação, em razão da remoção da água de hidratação dos metais, além da formação de radicais livres durante o processo de secagem.

Durante a secagem (desidratação), três eventos simultâneos ocorrem: as moléculas componentes do alimento são aproximadas, aumentando, conseqüentemente, a probabilidade de interação entre elas; a remoção da água do alimento acarreta a formação de microcapilares no produto, facilitando o acesso físico do oxigênio atmosférico; e a sensibilidade química dos componentes do alimento aumenta, devido à remoção da água de hidratação protetora dos sítios reativos das moléculas nos alimentos. A oxidação em alimentos secos ou desidratados é acelerada por diversos fatores, incluindo a exposição a luz e temperatura

Extração do Óleo de Soja e Sub Produtos

Durante o processamento, os componentes são extraídos dos grãos de soja por solventes orgânicos como o hexano (10 mL/g) na temperatura de ebulição ($\sim 70^\circ\text{C}$). Após a extração o solvente é então evaporado obtendo-se o óleo bruto. Posteriormente é então refinado com o intuito de melhorar a aparência, odor, sabor e estabilidade. Estas substâncias incluem os *ácidos graxos livres*, *fosfolipídios*, *carboidratos*, *proteínas* e *produtos de sua degradação*, *água*, *pigmentos (clorofila e carotenóides)* e *resíduos de pesticidas*. Deve-se seguir as orientações do instrutor e montar o extrator Soxhlet.



- 1 - Listar os principais ácidos graxos encontrados no óleo de soja.
- 2 - Montar três possíveis triglicerídios mistos.
- 3 - Esquematizar e explicar o funcionamento do extrator Soxhlet.

Índice de Peróxido: Determinação e Quantificação

O índice de peróxido (IP) é um indicador muito sensível no estágio inicial da oxidação, e sua presença é indício de que a deterioração do sabor e odor, em função de sua instabilidade, está por acontecer. Quando sua concentração atinge certo nível, mudanças complexas ocorrem, formando compostos de baixo peso molecular, oriundos de sua degradação.

Estes compostos, *aldeídos*, *cetonas*, *ácidos*, *álcoois* e *hidrocarbonetos*, são os responsáveis pelo sabor e odor característicos de produtos rançosos. Inevitavelmente, são decompostos mesmo em temperatura ambiente, produzindo moléculas pequenas, em especial compostos carbonílicos. Em temperatura elevada, a velocidade de formação dos peróxidos é menor que a de sua decomposição. Portanto, esta medição é limitada em razão da natureza transitória do peróxido, isto é, sua decomposição em produtos secundários (Figura 1.29) pode subestimar o grau de oxidação, ou seja, baixos valores podem representar o estágio inicial ou avançado da oxidação.

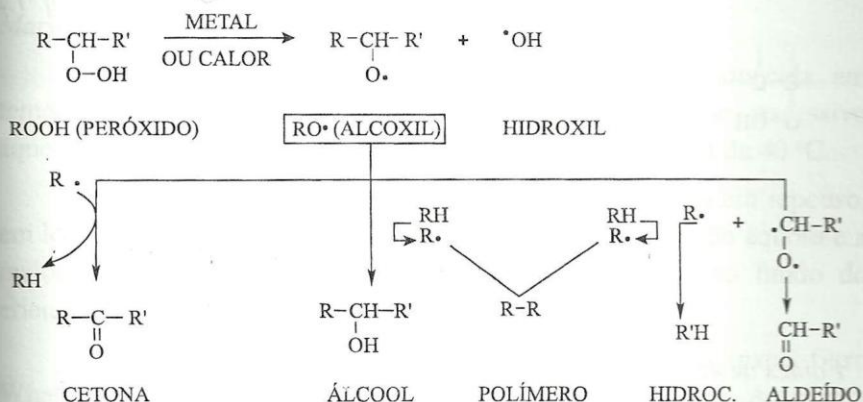


Figura 1.29 - Decomposição do peróxido em produtos secundários.

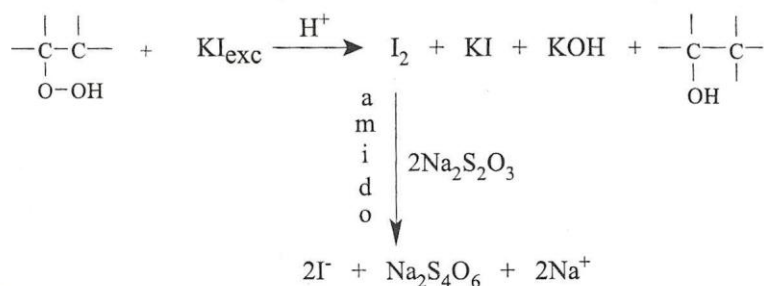
Reagentes

- Ácido acético - clorofórmio (3:2)
- Solução saturada de KI e amido 1,0%
- Solução de tiosulfato de sódio 0,1 N padronizada

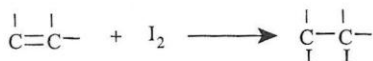
*Procedimento**A - Quantitativo*

Os peróxidos podem ser medidos por meio de técnica baseada em sua habilidade de liberar o iodo do iodeto de potássio. Seu teor é geralmente expresso em miliequivalentes (meq) de peróxido por quilograma de óleo ou gordura. Tal processo determina todas as substâncias de miliequivalentes de peróxido por 1.000 gramas de amostra, o qual oxida o iodeto de potássio nas condições de teste (eq. 1.29). Geralmente, presume-se estar presentes peróxidos ou produtos similares no óleo ou na gordura oxidados. Essa técnica é bastante empírica, e qualquer variação em seu procedimento redonda em resultados variados.

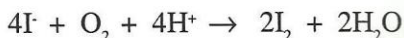
eq. 1.29

*Fontes de erro*

- Variação no peso da amostra e na pureza do solvente
- Absorção do iodo pelos ácidos graxos insaturados:



- Liberação do iodo pelo oxigênio dissolvido na solução a ser titulada, resultando em valores elevados:



Óleos ou gorduras

- a - Pesar 5,0 g da amostra em erlenmeyer de 250 ml.
- b - Adicionar 30,0 ml da solução ácido acético-clorofórmio.
- c - Agitar até a completa dissolução da amostra.
- d - Adicionar 0,5 ml de KI.
- e - Deixar em repouso por 1,0 min e adicionar 30 ml de água.
- f - Titular com a solução 0,1 N de tiosulfato de sódio, agitando constantemente. Continuar a titulação até que a cor amarela tenha quase desaparecido.
- g - Adicionar 0,5 ml da solução indicadora de amido e continuar a titular até o desaparecimento da coloração azul.
- h - Preparar a amostra do branco, simultaneamente.

Margarina

- Dissolver a amostra, com agitação, em placa aquecida em temperatura moderada ou em estufa a 60-70 °C. Evitar excessivo aquecimento ou exposição prolongada em temperatura acima de 40 °C.
- Após a dissolução da amostra, removê-la e deixá-la em repouso, em local aquecido em temperatura moderada, até que a fração aquosa e a maioria das partículas sólidas tenham sido depositadas no fundo do erlenmeyer.
- Decantar o óleo em um béquer limpo e filtrá-lo (papel-filtro Whatman nº 4 ou equivalente), passando-o para outro béquer. A amostra deve estar clara e brilhante.
- Preparar o branco, omitindo somente a amostra.
- Proceder como para óleos ou gorduras (passos b a g).

B - Qualitativo

Reagentes

- Amido solúvel: 2,0 g.
- Iodeto de potássio: 0,5 g.
- Tiossulfato de sódio: 0,01 g (protege a placa contra o escurecimento).
- Ácido cítrico: 0,1 g (torna a cor azul resultante mais brilhante).

Obs.: O amido deve ser dissolvido inicialmente em água quente (10,0 ml). Após a dissolução, adicionar mais 90 ml de água quente, esperar esfriar e adicionar as outras substâncias.

Procedimento

- Adicionar uma gota de óleo e espalhar em folha de sílica-gel.
- Mergulhar a folha contendo o óleo na solução descrita anteriormente e secar em ar quente.
- Mergulhar a folha em água.

Obs.: Os componentes reativos das folhas-teste são KI e amido; ácido (catalisador) é necessário para o teste de peróxido. Por ser a sílica-gel um ácido de Lewis, os hidroperóxidos poderão reagir com o KI em meio não-aquoso, sem a adição de nenhum ácido. O iodeto de potássio reage com o hidroperóxido, liberando iodo. A folha é colocada em água, onde desenvolve a coloração azul, típica da presença de hidroperóxido.

EXERCÍCIOS

- 1) Mostre, através de equações apropriadas, como o cobre atua na auto-oxidação de lipídios.
- 2) Dez gramas de uma amostra de gordura foram analisados para determinar o IP, consumindo 26,80 ml de uma solução de tiossulfato de sódio 0,1055 N. Calcular o índice de peróxido.
- 3) Calcular o índice de peróxido, a partir dos dados a seguir:

Amostra*	Peso (g)	Na ₂ S ₂ O ₃ (0,1249 N)	IP
Óleo de milho	5,0	0,10	?
Óleo de soja	5,4	3,91	?
Azeite de oliva	5,0	7,30	?
Margarina	5,0	0,15	?
Gordura	5,1	8,4	?

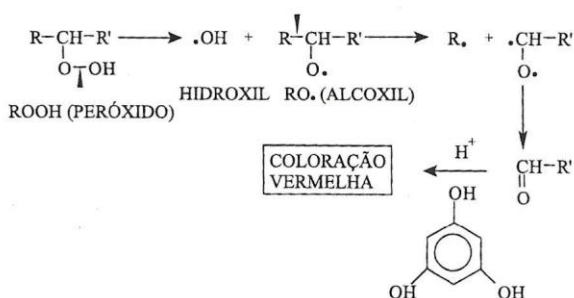
(*) Duplicata.

4) Os alimentos, de modo geral, possuem ácidos graxos insaturados (oleico, linoléico, linolênico e araquidônico). Mostrar, por meio das reações de oxidação, a formação dos hidroperóxidos e sua nomenclatura correspondente.

Detecção de Aldeídos: Teste de Kreis

Os peróxidos formados durante a oxidação de lipídios são instáveis, decompondo-se em diversos produtos intermediários e específicos para cada tipo de ácido graxo envolvido. O teste de Kreis é um procedimento qualitativo rápido, indicativo da oxidação de óleos e gorduras. Baseia-se na formação da coloração vermelha, resultante da reação da floroglucina com os produtos da degradação do peróxido em meio ácido (eq. 1.30) ou da reação de outros produtos da oxidação de óleos ou gorduras com a floroglucina. A limitação deste método deve-se à formação da coloração típica sem que o produto esteja oxidado, isto é, amostras não-oxidadas podem desenvolver reação positiva com o reagente de Kreis.

eq. 1.30

*Reagentes*

- Floroglucinol (1,0% em éter etílico).
- HCl concentrado.

Procedimento

- Transferir 2,0 ml de óleo ou gordura para tubo de ensaio.
- Adicionar 2,0 ml da solução de floroglucinol.
- Adicionar 2,0 ml de HCl concentrado e agitar o tubo.

Obs.: O aparecimento da coloração rosa-avermelhada indica a presença de aldeídos.

EXERCÍCIOS

1) Indicar, com a numeração apropriada na coluna 2 do quadro abaixo, os aldeídos resultantes da decomposição dos hidroperóxidos:

Coluna 1	Coluna 2
A : 11-hidroperóxido-9-ENE	—— 2,4-decadienal
B : 9-hidroperóxido-10,12-DIENE	—— octanal
C : 13-hidroperóxido-9,11-DIENE	—— 2-undecenal
D : 8-hidroperóxido-9-ENE	—— 2-decenal
E : 12-hidroperóxido-9,13,15-TRIENE	—— nonanal
F : 11-hidroperóxido-9,12-DIENE	—— hexanal
G : 9-hidroperóxido-10-ENE	—— 2-octenal
H : 10-hidroperóxido-8-ENE.	

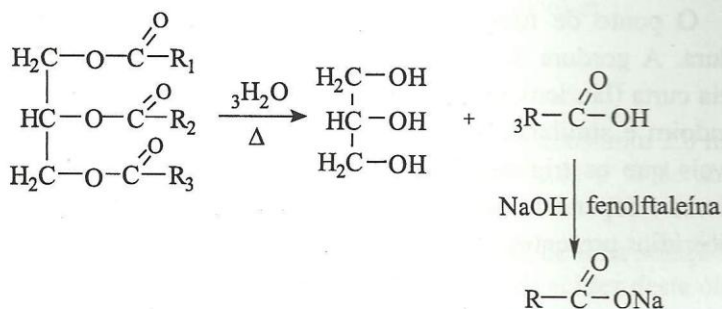
2) Dar a origem dos aldeídos listados a seguir, preenchendo os espaços à sua esquerda: O (oléico), L (linoléico), LE (linolênico) e A (araquidônico) após a decomposição dos hidroperóxidos formados a partir dos ácidos graxos mencionados:

— 2-decenal	— 2,5-octadienal	— 2,4,7-decatrienal
— propanal	— 2,4-heptadienal	— hexanal
— octanal	— nonanal	— 2,5,8-tetradecatrienal
— 2-octenal	— 3-hexenal	— 3,6-dodecadialenal

Determinação de Ácidos Graxos Livres

Este método determina a presença de ácidos graxos livres (AGL) em óleos e, ou, gorduras vegetais e animais. Para a titulação da gordura, constituída de ácidos fracos, é necessário o uso de base forte, o que faz com que o ponto de equivalência estequiométrica se dê no lado alcalino. A acidez é estimada pela titulação com o hidróxido de sódio, utilizando-se fenolftaleína como indicador (eq. 1.31).

eq. 1.31



A neutralização com base (NaOH) é geralmente utilizada para a maioria dos óleos após sua extração. Óleos e, ou, gorduras utilizados em processos de frituras são muito suscetíveis à hidrólise pela ação da temperatura elevada na presença de água (Figura 1.23). Nesta situação, ocorre diminuição do ponto de fumaça (temperatura na qual a fumaça começa a ser exalada da superfície do óleo aquecido por causa da decomposição do triacilglicerol na presença de oxigênio). Portanto, a fumaça é sinal de decomposição (Tabela 1.18). O ponto de fumaça de óleos e, ou, gordura está na faixa de 200-300 °C; quando cai para abaixo de 170 °C, o óleo ou a gordura são considerados inadequados para uso como alimento.

Tabela 1.18 - Ácidos graxos livres e ponto de fumaça de alguns óleos e gorduras

Amostra	% AGL	Ponto de fumaça (°C)
Azeite de oliva	2,10	138
Óleo de girassol	1,70	159
Óleo de soja	0,01	228
Óleo de milho	0,01	233
Óleo de milho	1,00	94
Óleo de algodão	0,01	232
Óleo de algodão	1,00	160

O ponto de fumaça é dependente da composição do óleo e da gordura. A gordura de coco, por exemplo, que possui ácidos graxos de cadeia curta (láurico), resiste menos à temperatura que o óleo de algodão, amendoim e similares. Ácidos graxos, mono e diglicerídios são menos estáveis que os triglicerídios. Portanto, o ponto de fumaça de óleos e gorduras é dependente da quantidade de ácidos graxos livres e de mono e diglicerídios presentes na amostra.

Reagentes

- Éter etílico.
- Álcool etílico 95%.
- Fenolftaleína 1,0% em álcool etílico 95% (ponto de viragem entre pH 8,1 e 8,3).
- Hidróxido de sódio 0,1 N padronizado.

Procedimento

- Pesar 28,2 g da amostra em erlenmeyer de 250 ml.
- Adicionar 50 ml da solução éter-álcool (2:1) e 2,0 ml do indicador.
- Titular com hidróxido de sódio 0,1 N até o aparecimento da coloração rósea; esta coloração deve persistir durante 30 segundos.

Cálculos

A) Índice de acidez: quantidade em mg de KOH necessária para neutralizar os ácidos graxos livres presentes em 1,0 g de gordura.

B) Percentagem de ácidos graxos livres: normalmente é expressa em função do ácido oléico (PM = 282). Para gorduras de coco e babaçu, o resultado é expresso em ácidos láurico (PM = 200) e palmítico (PM = 256), respectivamente. % de AGL = $\text{gramas AGL} / 100 \text{ g de gordura}$.

EXERCÍCIOS

1) Na análise de AGL, em 5,0 g de gordura de coco consumiram-se 6,25 ml de KOH 0,1 N para neutralizar a gordura. Calcular:

a) % de AGL expressa em ácido láurico.

b) Índice de acidez da gordura de coco.

2) Se uma amostra de 5,0 g de gordura de coco consumiu 2,0 ml de NaOH 0,1 N para neutralizar a acidez da gordura, qual a % de ácidos graxos livres expressa em láurico?

3) Se 2,5 g de óleo de soja consumiram 3,1 ml de uma solução 0,1 N de KOH para titular a fenolftaleína, qual o índice de acidez deste óleo?

4) Quais as desvantagens da presença de alto teor de ácidos graxos livres em óleos bruto e refinado?

5) Os seguintes resultados foram obtidos na análise de ácidos graxos livres (AGL):

Amostra	Peso (g)	NaOH 0,1 N (ml)
Óleo de milho	28,0	0,45
Óleo de amendoim	27,8	0,40

Calcular a % de AGL expressa em ácido oléico e o índice de acidez.

6) Os seguintes resultados foram obtidos na análise de ácidos graxos livres. Completar o quadro:

Amostra	Peso (g)	ml NaOH 0,1006 N	% AGL (Oléico)	% AGL (Láurico)	% AGL (Palm.)
Gord. de coco	28,2	25,0	?	?	?
	28,4	25,2			
Óleo de soja	30,0	0,1	?	?	?
	28,2	0,1			

7) Na fabricação de pizza, os seguintes ingredientes são utilizados:

- massa: farinha de trigo + água;

- cobertura: molho de tomate, queijo, condimentos, tomate, pimentão e presunto.

O produto final é então pré-cozido, resfriado, embalado e congelado. Analisar do ponto de vista da oxidação (lipoxigenase) e rancidez hidrolítica (lípsases) se é possível ocorrer as seguintes alterações durante o armazenamento:

1. Aparecimento de sabor e odor estranho.
2. Descoloração de vegetais.
3. Perda do sabor dos condimentos.

Determinação do Índice de Saponificação

Índice de saponificação (IS) é a quantidade de base necessária para saponificar definida quantidade de óleo e, ou, gordura. É expresso em número de miligramas de hidróxido de potássio necessário para saponificar 1,0 g da amostra.

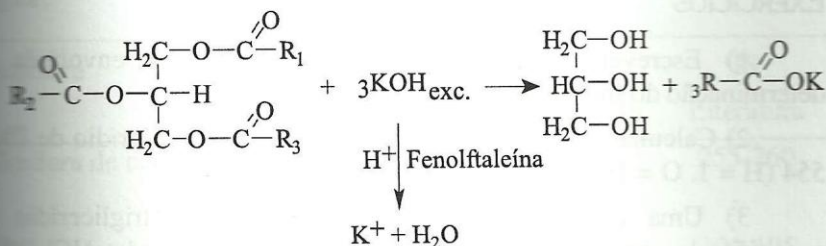
O índice de saponificação indica o PM médio dos ácidos graxos esterificados ao glicerol (Tabela 1.2).

* IS pequeno: ácido graxo de PM elevado.

* IS elevado: ácido graxo de PM pequeno.

Esse procedimento inclui aquecimento da solução alcoólica de hidróxido de potássio em excesso, contendo uma quantidade conhecida da amostra, até a completa saponificação. O excesso de base é então titulado com ácido padronizado, e o índice de saponificação, calculado (eq. 1.32).

eq. 1.32



Reagentes

- Ácido clorídrico 0,5 N padronizado.
- Hidróxido de potássio 0,5 N em ETOH 95%.
- Fenolftaleína: 1,0 % em ETOH 95%.

Procedimento

- Pesar 5,0 g da amostra (fundir, se necessário) em balão de 250 ml. Filtrar em papel-filtro para remoção da umidade, se necessário.
- Adicionar 50,0 ml da solução alcoólica de KOH.
- Preparar a amostra do branco, simultaneamente.
- Conectar o condensador e aquecer sob refluxo durante uma hora.
- Após o resfriamento, adicionar 1,0 ml do indicador e titular com ácido clorídrico 0,5 N até o desaparecimento da coloração rósea.

Obs.: O índice de saponificação para amostra contendo somente ácido graxo é igual ao índice de acidez. O índice de éster é a diferença entre o índice de saponificação e o de acidez. Pelo índice de éster, estima-se a quantidade de glicerídio presente em óleos e gorduras.

Fontes de erro

- Imprecisão nas medições.
- Saponificação incompleta.
- Contaminação de vidrarias.
- Perda de ésteres voláteis pelo condensador.
- Presença de substâncias interferentes.

EXERCÍCIOS

1) Escrever a equação molecular balanceada envolvida na determinação do índice de saponificação.

2) Calcular o índice de saponificação de um triglicerídio de PM = 554 (H = 1, O = 16, C = 12 e K = 39).

3) Uma amostra de 3,0 g de determinado triglicerídio foi saponificada com solução alcoólica de KOH e titulada com HCl 0,5 N. Dados:

* Volume gasto na titulação do branco = 67,52 ml.

* Volume gasto na titulação da amostra = 7,95 ml.

Pergunta-se:

a) Qual o índice de saponificação deste triglicerídio?

b) Qual é o seu PM?

c) Por que a titulação do branco consumiu volume maior de HCl 0,5N que a da solução contendo a amostra?

d) Relacionando o IS com o PM médio, deduza o nome deste triglicerídio.

Dados: PM do KOH = 56,1; triestearina = 891; tricaprilina = 470; tributirina = 302 e tricaprionina = 386.

4) Se o índice de saponificação da gordura do leite é de 230, qual o PM médio dos ácidos graxos constituintes?

5) Calcular o índice de saponificação dos triglicerídios:

a - Tripalmitina (PM=806,8).

b - Tricaprina (PM=554).

c - Tributirina (PM=302,2).

d - Palmitodiestearina (PM=862).

6) Se o índice de saponificação de um monoglicerídio puro foi de 257,34, qual o peso molecular e o nome?

7) Uma amostra de óleo de oliva (250 mg) consumiu 47,5 mg de KOH para uma completa saponificação. Calcular o PM médio do triglicerídio presente na amostra.

8) Calcular o índice de saponificação das amostras listadas a seguir:

Amostra	Peso	ml HCl	IS	IS
	(g)	0,5214 N	Calculado	Literatura
Gordura de coco	4,4965	16,5	?	255-260
	4,1209	13,5		
Óleo vegetal	4,6880	18,9	?	190-195
	5,1410	22,0		
Branco		52,9		
		53,1		

Determinação do Índice de Iodo

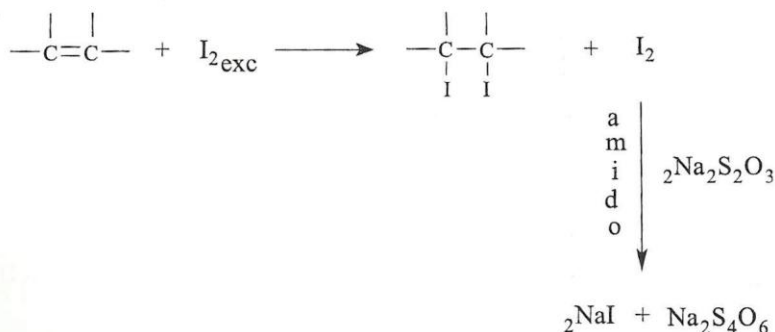
O Índice de Iodo (II) é a medida da insaturação de óleos e, ou, gorduras, expressa em número de gramas de iodo absorvido por 100,0 g da amostra. Por conseguinte, II elevado significa alto grau de insaturação.

Basicamente, esta determinação consiste da adição em excesso de iodo à amostra de peso conhecido, com o que se determina a quantidade de iodo livre em solução, fazendo a titulação com tiosulfato, em presença de amido, como indicador (eq. 1.33). Praticamente, óleos e, ou, gorduras comestíveis contêm índice de iodo variando entre 65 e 130.

CLASSIFICAÇÃO: segundo o II (Tabela 1.2), óleos e gorduras comestíveis são classificados em:

- Secativos: II = 130 a 200.
- Não-secativos: II < 100.
- Semi-secativos: II de valor intermediário.

eq. 1.33



Reagentes

- Solução de Wijs (monocloreto de iodo, ICl).
- Tiosulfato de sódio 0,1 N padronizado.
- Iodeto de potássio: 15,0 %.
- Solução de amido: 1,0 %.

Procedimento

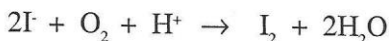
- Pesar (0,5 g)* de óleo e, ou, gordura em erlenmeyer de 250 ml com rolha esmerilhada.
- Adicionar 15,0 ml de clorofórmio para dissolução da amostra.
- Acrescentar 25,0 ml da solução de Wijs.
- Arrolhar o frasco e agitar; deixar em repouso no escuro durante 30 min.
- Adicionar 20,0 ml de solução de KI.
- Finalmente, acrescentar 100,0 ml de água e titular com solução 0,1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, usando amido (1,0ml) como indicador até o desaparecimento da coloração azul.
- Preparar a amostra do branco, simultaneamente.

* Fundir a amostra, se for o caso. Filtrar em papel-filtro para remoção de impurezas e umidade. A quantidade da amostra recomendada, a ser pesada em função do índice de iodo, deve ser a seguinte:

Índice de iodo	Peso da amostra (g)
3,0	10,0
5,0	5,1 - 6,3
10,0	2,5 - 3,2
20,0	0,85 - 1,6
60,0	0,43 - 0,53
80,0	0,30 - 0,40
120,0	0,21 - 0,26
160,0	0,16 - 0,20

Fontes de erro

- Variação no peso da amostra.
- Variação nas condições da reação: tempo e temperatura.
- Deterioração do halogênio pela luz ou pelo oxigênio:



- Adição do halogênio na posição alfa da insaturação:



EXERCÍCIOS

1) Calcular o índice de iodo das seguintes amostras e discutir os resultados obtidos, comparando-os com os da literatura:

2) Calcular o índice de iodo do ácido araquidônico (PM = 304).

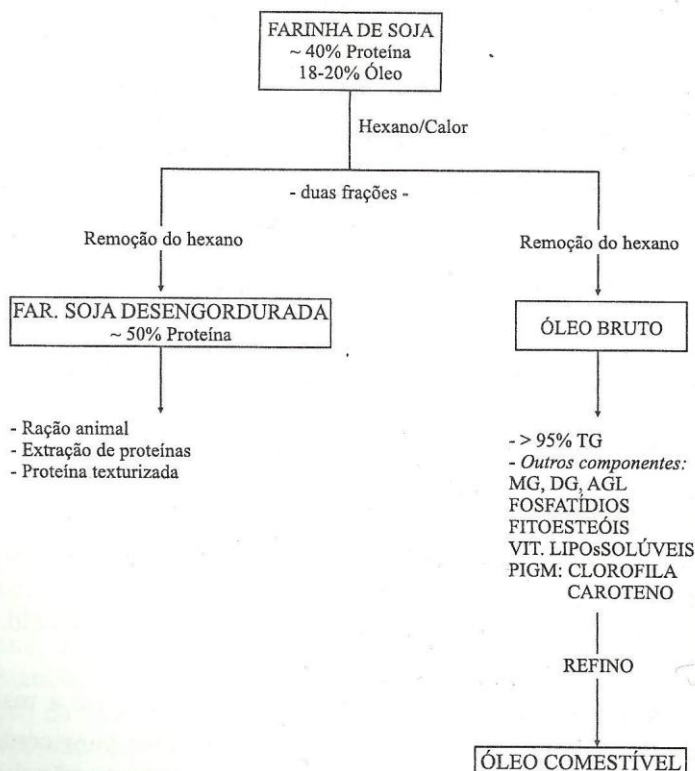
3) Calcular o índice de iodo da triaraquidonina (PM araquidônico = 304).

4) Calcular o índice de iodo do triglicerídio misto (palmitil-oleil-araquidonina) PM = 860.

Amostra	Peso (g)	ml Na ₂ S ₂ O ₃ (0,1057N)	(II) Calculado	(II) Literatura
Óleo de soja	0,2410	11,50	?	125-138
	0,2258	18,50		
Óleo de milho	0,2417	1,60	?	110-128
	0,2545	1,35		
Óleo de amendoim	0,3800	10,65	?	84-102
	0,4006	10,20		
Gord. hidrogenada	0,5804	14,65	?	
	0,5897	13,90		
Branco	-	34,50		
		34,65		

Extração do Óleo de Soja e Sub Produtos

Durante o processamento, os componentes são extraídos dos grãos de soja por solventes orgânicos como o hexano (10 mL/g) na temperatura de ebulição ($\sim 70^\circ\text{C}$). Após a extração o solvente é então evaporado obtendo-se o óleo bruto. Posteriormente é então refinado com o intuito de melhorar a aparência, odor, sabor e estabilidade. Estas substâncias incluem os *ácidos graxos livres*, *fosfolipídios*, *carboidratos*, *proteínas* e *produtos de sua degradação*, *água*, *pigmentos (clorofila e carotenóides)* e *resíduos de pesticidas*. Deve-se seguir as orientações do instrutor e montar o extrator Soxhlet.



- 1 - Listar os principais ácidos graxos encontrados no óleo de soja.
- 2 - Montar três possíveis triglicerídios mistos.
- 3 - Esquematizar e explicar o funcionamento do extrator Soxhlet.

Índice de Peróxido: Determinação e Quantificação

O índice de peróxido (IP) é um indicador muito sensível no estágio inicial da oxidação, e sua presença é indício de que a deterioração do sabor e odor, em função de sua instabilidade, está por acontecer. Quando sua concentração atinge certo nível, mudanças complexas ocorrem, formando compostos de baixo peso molecular, oriundos de sua degradação.

Estes compostos, *aldeídos*, *cetonas*, *ácidos*, *álcoois* e *hidrocarbonetos*, são os responsáveis pelo sabor e odor característicos de produtos rançosos. Inevitavelmente, são decompostos mesmo em temperatura ambiente, produzindo moléculas pequenas, em especial compostos carbonílicos. Em temperatura elevada, a velocidade de formação dos peróxidos é menor que a de sua decomposição. Portanto, esta medição é limitada em razão da natureza transitória do peróxido, isto é, sua decomposição em produtos secundários (Figura 1.29) pode subestimar o grau de oxidação, ou seja, baixos valores podem representar o estágio inicial ou avançado da oxidação.

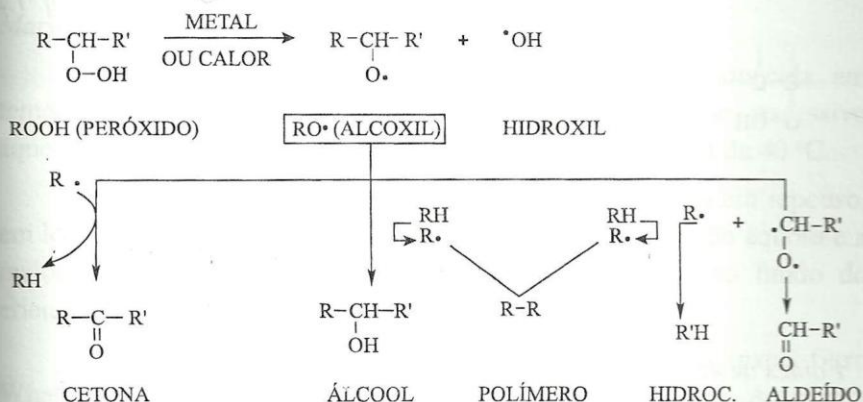


Figura 1.29 - Decomposição do peróxido em produtos secundários.

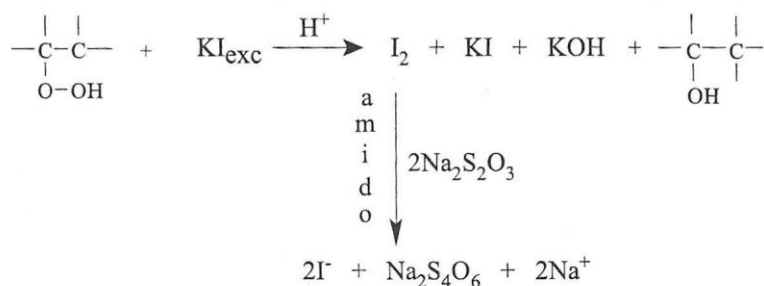
Reagentes

- Ácido acético - clorofórmio (3:2)
- Solução saturada de KI e amido 1,0%
- Solução de tiosulfato de sódio 0,1 N padronizada

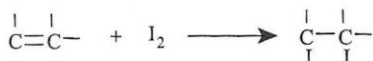
*Procedimento**A - Quantitativo*

Os peróxidos podem ser medidos por meio de técnica baseada em sua habilidade de liberar o iodo do iodeto de potássio. Seu teor é geralmente expresso em miliequivalentes (meq) de peróxido por quilograma de óleo ou gordura. Tal processo determina todas as substâncias de miliequivalentes de peróxido por 1.000 gramas de amostra, o qual oxida o iodeto de potássio nas condições de teste (eq. 1.29). Geralmente, presume-se estar presentes peróxidos ou produtos similares no óleo ou na gordura oxidados. Essa técnica é bastante empírica, e qualquer variação em seu procedimento redonda em resultados variados.

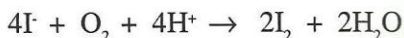
eq. 1.29

*Fontes de erro*

- Variação no peso da amostra e na pureza do solvente
- Absorção do iodo pelos ácidos graxos insaturados:



- Liberação do iodo pelo oxigênio dissolvido na solução a ser titulada, resultando em valores elevados:



Óleos ou gorduras

- a - Pesar 5,0 g da amostra em erlenmeyer de 250 ml.
- b - Adicionar 30,0 ml da solução ácido acético-clorofórmio.
- c - Agitar até a completa dissolução da amostra.
- d - Adicionar 0,5 ml de KI.
- e - Deixar em repouso por 1,0 min e adicionar 30 ml de água.
- f - Titular com a solução 0,1 N de tiosulfato de sódio, agitando constantemente. Continuar a titulação até que a cor amarela tenha quase desaparecido.
- g - Adicionar 0,5 ml da solução indicadora de amido e continuar a titular até o desaparecimento da coloração azul.
- h - Preparar a amostra do branco, simultaneamente.

Margarina

- Dissolver a amostra, com agitação, em placa aquecida em temperatura moderada ou em estufa a 60-70 °C. Evitar excessivo aquecimento ou exposição prolongada em temperatura acima de 40 °C.
- Após a dissolução da amostra, removê-la e deixá-la em repouso, em local aquecido em temperatura moderada, até que a fração aquosa e a maioria das partículas sólidas tenham sido depositadas no fundo do erlenmeyer.
- Decantar o óleo em um béquer limpo e filtrá-lo (papel-filtro Whatman nº 4 ou equivalente), passando-o para outro béquer. A amostra deve estar clara e brilhante.
- Preparar o branco, omitindo somente a amostra.
- Proceder como para óleos ou gorduras (passos b a g).

B - Qualitativo

Reagentes

- Amido solúvel: 2,0 g.
- Iodeto de potássio: 0,5 g.
- Tiossulfato de sódio: 0,01 g (protege a placa contra o escurecimento).
- Ácido cítrico: 0,1 g (torna a cor azul resultante mais brilhante).

Obs.: O amido deve ser dissolvido inicialmente em água quente (10,0 ml). Após a dissolução, adicionar mais 90 ml de água quente, esperar esfriar e adicionar as outras substâncias.

Procedimento

- Adicionar uma gota de óleo e espalhar em folha de sílica-gel.
- Mergulhar a folha contendo o óleo na solução descrita anteriormente e secar em ar quente.
- Mergulhar a folha em água.

Obs.: Os componentes reativos das folhas-teste são KI e amido; ácido (catalisador) é necessário para o teste de peróxido. Por ser a sílica-gel um ácido de Lewis, os hidroperóxidos poderão reagir com o KI em meio não-aquoso, sem a adição de nenhum ácido. O iodeto de potássio reage com o hidroperóxido, liberando iodo. A folha é colocada em água, onde desenvolve a coloração azul, típica da presença de hidroperóxido.

EXERCÍCIOS

- 1) Mostre, através de equações apropriadas, como o cobre atua na auto-oxidação de lipídios.
- 2) Dez gramas de uma amostra de gordura foram analisados para determinar o IP, consumindo 26,80 ml de uma solução de tiossulfato de sódio 0,1055 N. Calcular o índice de peróxido.
- 3) Calcular o índice de peróxido, a partir dos dados a seguir:

Amostra*	Peso (g)	Na ₂ S ₂ O ₃ (0,1249 N)	IP
Óleo de milho	5,0	0,10	?
Óleo de soja	5,4	3,91	?
Azeite de oliva	5,0	7,30	?
Margarina	5,0	0,15	?
Gordura	5,1	8,4	?

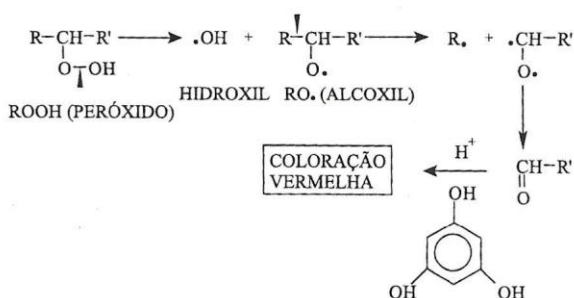
(*) Duplicata.

4) Os alimentos, de modo geral, possuem ácidos graxos insaturados (oleico, linoléico, linolênico e araquidônico). Mostrar, por meio das reações de oxidação, a formação dos hidroperóxidos e sua nomenclatura correspondente.

Detecção de Aldeídos: Teste de Kreis

Os peróxidos formados durante a oxidação de lipídios são instáveis, decompondo-se em diversos produtos intermediários e específicos para cada tipo de ácido graxo envolvido. O teste de Kreis é um procedimento qualitativo rápido, indicativo da oxidação de óleos e gorduras. Baseia-se na formação da coloração vermelha, resultante da reação da floroglucina com os produtos da degradação do peróxido em meio ácido (eq. 1.30) ou da reação de outros produtos da oxidação de óleos ou gorduras com a floroglucina. A limitação deste método deve-se à formação da coloração típica sem que o produto esteja oxidado, isto é, amostras não-oxidadas podem desenvolver reação positiva com o reagente de Kreis.

eq. 1.30

*Reagentes*

- Floroglucinol (1,0% em éter etílico).
- HCl concentrado.

Procedimento

- Transferir 2,0 ml de óleo ou gordura para tubo de ensaio.
- Adicionar 2,0 ml da solução de floroglucinol.
- Adicionar 2,0 ml de HCl concentrado e agitar o tubo.

Obs.: O aparecimento da coloração rosa-avermelhada indica a presença de aldeídos.

EXERCÍCIOS

1) Indicar, com a numeração apropriada na coluna 2 do quadro abaixo, os aldeídos resultantes da decomposição dos hidroperóxidos:

Coluna 1	Coluna 2
A : 11-hidroperóxido-9-ENE	—— 2,4-decadienal
B : 9-hidroperóxido-10,12-DIENE	—— octanal
C : 13-hidroperóxido-9,11-DIENE	—— 2-undecenal
D : 8-hidroperóxido-9-ENE	—— 2-decenal
E : 12-hidroperóxido-9,13,15-TRIENE	—— nonanal
F : 11-hidroperóxido-9,12-DIENE	—— hexanal
G : 9-hidroperóxido-10-ENE	—— 2-octenal
H : 10-hidroperóxido-8-ENE.	

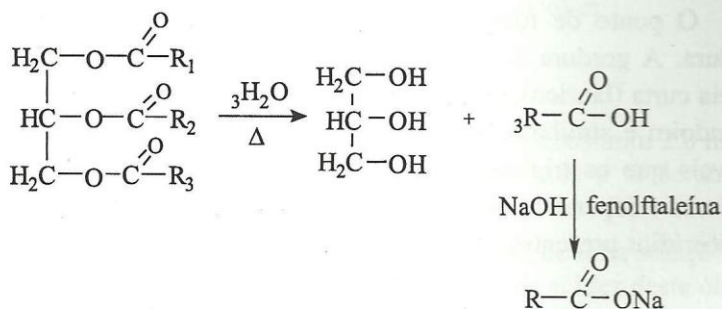
2) Dar a origem dos aldeídos listados a seguir, preenchendo os espaços à sua esquerda: O (oléico), L (linoléico), LE (linolênico) e A (araquidônico) após a decomposição dos hidroperóxidos formados a partir dos ácidos graxos mencionados:

— 2-decenal	— 2,5-octadienal	— 2,4,7-decatrienal
— propanal	— 2,4-heptadienal	— hexanal
— octanal	— nonanal	— 2,5,8-tetradecatrienal
— 2-octenal	— 3-hexenal	— 3,6-dodecadienal

Determinação de Ácidos Graxos Livres

Este método determina a presença de ácidos graxos livres (AGL) em óleos e, ou, gorduras vegetais e animais. Para a titulação da gordura, constituída de ácidos fracos, é necessário o uso de base forte, o que faz com que o ponto de equivalência estequiométrica se dê no lado alcalino. A acidez é estimada pela titulação com o hidróxido de sódio, utilizando-se fenolftaleína como indicador (eq. 1.31).

eq. 1.31



A neutralização com base (NaOH) é geralmente utilizada para a maioria dos óleos após sua extração. Óleos e, ou, gorduras utilizados em processos de frituras são muito suscetíveis à hidrólise pela ação da temperatura elevada na presença de água (Figura 1.23). Nesta situação, ocorre diminuição do ponto de fumaça (temperatura na qual a fumaça começa a ser exalada da superfície do óleo aquecido por causa da decomposição do triacilglicerol na presença de oxigênio). Portanto, a fumaça é sinal de decomposição (Tabela 1.18). O ponto de fumaça de óleos e, ou, gordura está na faixa de 200-300 °C; quando cai para abaixo de 170 °C, o óleo ou a gordura são considerados inadequados para uso como alimento.

Tabela 1.18 - Ácidos graxos livres e ponto de fumaça de alguns óleos e gorduras

Amostra	% AGL	Ponto de fumaça (°C)
Azeite de oliva	2,10	138
Óleo de girassol	1,70	159
Óleo de soja	0,01	228
Óleo de milho	0,01	233
Óleo de milho	1,00	94
Óleo de algodão	0,01	232
Óleo de algodão	1,00	160

O ponto de fumaça é dependente da composição do óleo e da gordura. A gordura de coco, por exemplo, que possui ácidos graxos de cadeia curta (láurico), resiste menos à temperatura que o óleo de algodão, amendoim e similares. Ácidos graxos, mono e diglicerídios são menos estáveis que os triglicerídios. Portanto, o ponto de fumaça de óleos e gorduras é dependente da quantidade de ácidos graxos livres e de mono e diglicerídios presentes na amostra.

Reagentes

- Éter etílico.
- Álcool etílico 95%.
- Fenolftaleína 1,0% em álcool etílico 95% (ponto de viragem entre pH 8,1 e 8,3).
- Hidróxido de sódio 0,1 N padronizado.

Procedimento

- Pesar 28,2 g da amostra em erlenmeyer de 250 ml.
- Adicionar 50 ml da solução éter-álcool (2:1) e 2,0 ml do indicador.
- Titular com hidróxido de sódio 0,1 N até o aparecimento da coloração rósea; esta coloração deve persistir durante 30 segundos.

Cálculos

A) Índice de acidez: quantidade em mg de KOH necessária para neutralizar os ácidos graxos livres presentes em 1,0 g de gordura.

B) Percentagem de ácidos graxos livres: normalmente é expressa em função do ácido oléico (PM = 282). Para gorduras de coco e babaçu, o resultado é expresso em ácidos láurico (PM = 200) e palmítico (PM = 256), respectivamente. % de AGL = $\text{gramas AGL} / 100 \text{ g de gordura}$.

EXERCÍCIOS

1) Na análise de AGL, em 5,0 g de gordura de coco consumiram-se 6,25 ml de KOH 0,1 N para neutralizar a gordura. Calcular:

a) % de AGL expressa em ácido láurico.

b) Índice de acidez da gordura de coco.

2) Se uma amostra de 5,0 g de gordura de coco consumiu 2,0 ml de NaOH 0,1 N para neutralizar a acidez da gordura, qual a % de ácidos graxos livres expressa em láurico?

3) Se 2,5 g de óleo de soja consumiram 3,1 ml de uma solução 0,1 N de KOH para titular a fenolftaleína, qual o índice de acidez deste óleo?

4) Quais as desvantagens da presença de alto teor de ácidos graxos livres em óleos bruto e refinado?

5) Os seguintes resultados foram obtidos na análise de ácidos graxos livres (AGL):

Amostra	Peso (g)	NaOH 0,1 N (ml)
Óleo de milho	28,0	0,45
Óleo de amendoim	27,8	0,40

Calcular a % de AGL expressa em ácido oléico e o índice de acidez.

6) Os seguintes resultados foram obtidos na análise de ácidos graxos livres. Completar o quadro:

Amostra	Peso (g)	ml NaOH 0,1006 N	% AGL (Oléico)	% AGL (Láurico)	% AGL (Palm.)
Gord. de coco	28,2	25,0	?	?	?
	28,4	25,2			
Óleo de soja	30,0	0,1	?	?	?
	28,2	0,1			

7) Na fabricação de pizza, os seguintes ingredientes são utilizados:

- massa: farinha de trigo + água;

- cobertura: molho de tomate, queijo, condimentos, tomate, pimentão e presunto.

O produto final é então pré-cozido, resfriado, embalado e congelado. Analisar do ponto de vista da oxidação (lipoxigenase) e rancidez hidrolítica (lípsases) se é possível ocorrer as seguintes alterações durante o armazenamento:

1. Aparecimento de sabor e odor estranho.
2. Descoloração de vegetais.
3. Perda do sabor dos condimentos.

Determinação do Índice de Saponificação

Índice de saponificação (IS) é a quantidade de base necessária para saponificar definida quantidade de óleo e, ou, gordura. É expresso em número de miligramas de hidróxido de potássio necessário para saponificar 1,0 g da amostra.

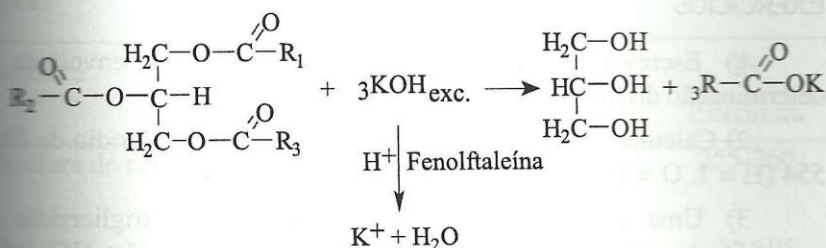
O índice de saponificação indica o PM médio dos ácidos graxos esterificados ao glicerol (Tabela 1.2).

* IS pequeno: ácido graxo de PM elevado.

* IS elevado: ácido graxo de PM pequeno.

Esse procedimento inclui aquecimento da solução alcoólica de hidróxido de potássio em excesso, contendo uma quantidade conhecida da amostra, até a completa saponificação. O excesso de base é então titulado com ácido padronizado, e o índice de saponificação, calculado (eq. 1.32).

eq. 1.32



Reagentes

- Ácido clorídrico 0,5 N padronizado.
- Hidróxido de potássio 0,5 N em ETOH 95%.
- Fenolftaleína: 1,0 % em ETOH 95%.

Procedimento

- Pesar 5,0 g da amostra (fundir, se necessário) em balão de 250 ml. Filtrar em papel-filtro para remoção da umidade, se necessário.
- Adicionar 50,0 ml da solução alcoólica de KOH.
- Preparar a amostra do branco, simultaneamente.
- Conectar o condensador e aquecer sob refluxo durante uma hora.
- Após o resfriamento, adicionar 1,0 ml do indicador e titular com ácido clorídrico 0,5 N até o desaparecimento da coloração rósea.

Obs.: O índice de saponificação para amostra contendo somente ácido graxo é igual ao índice de acidez. O índice de éster é a diferença entre o índice de saponificação e o de acidez. Pelo índice de éster, estima-se a quantidade de glicerídio presente em óleos e gorduras.

Fontes de erro

- Imprecisão nas medições.
- Saponificação incompleta.
- Contaminação de vidrarias.
- Perda de ésteres voláteis pelo condensador.
- Presença de substâncias interferentes.

EXERCÍCIOS

1) Escrever a equação molecular balanceada envolvida na determinação do índice de saponificação.

2) Calcular o índice de saponificação de um triglicerídio de $PM = 554$ ($H = 1$, $O = 16$, $C = 12$ e $K = 39$).

3) Uma amostra de 3,0 g de determinado triglicerídio foi saponificada com solução alcoólica de KOH e titulada com HCl 0,5 N. Dados:

* Volume gasto na titulação do branco = 67,52 ml.

* Volume gasto na titulação da amostra = 7,95 ml.

Pergunta-se:

a) Qual o índice de saponificação deste triglicerídio?

b) Qual é o seu PM?

c) Por que a titulação do branco consumiu volume maior de HCl 0,5N que a da solução contendo a amostra?

d) Relacionando o IS com o PM médio, deduza o nome deste triglicerídio.

Dados: PM do KOH = 56,1; triestearina = 891; tricaprilina = 470; tributirina = 302 e tricaprionina = 386.

4) Se o índice de saponificação da gordura do leite é de 230, qual o PM médio dos ácidos graxos constituintes?

5) Calcular o índice de saponificação dos triglicerídios:

a - Tripalmitina (PM=806,8).

b - Tricaprina (PM=554).

c - Tributirina (PM=302,2).

d - Palmitodiestearina (PM=862).

6) Se o índice de saponificação de um monoglicerídio puro foi de 257,34, qual o peso molecular e o nome?

7) Uma amostra de óleo de oliva (250 mg) consumiu 47,5 mg de KOH para uma completa saponificação. Calcular o PM médio do triglicerídio presente na amostra.

8) Calcular o índice de saponificação das amostras listadas a seguir:

Amostra	Peso	ml HCl	IS	IS
	(g)	0,5214 N	Calculado	Literatura
Gordura de coco	4,4965	16,5	?	255-260
	4,1209	13,5		
Óleo vegetal	4,6880	18,9	?	190-195
	5,1410	22,0		
Branco		52,9		
		53,1		

Determinação do Índice de Iodo

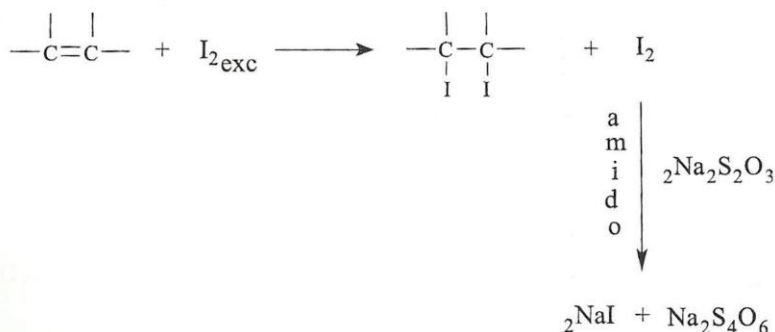
O Índice de Iodo (II) é a medida da insaturação de óleos e, ou, gorduras, expressa em número de gramas de iodo absorvido por 100,0 g da amostra. Por conseguinte, II elevado significa alto grau de insaturação.

Basicamente, esta determinação consiste da adição em excesso de iodo à amostra de peso conhecido, com o que se determina a quantidade de iodo livre em solução, fazendo a titulação com tiosulfato, em presença de amido, como indicador (eq. 1.33). Praticamente, óleos e, ou, gorduras comestíveis contêm índice de iodo variando entre 65 e 130.

CLASSIFICAÇÃO: segundo o II (Tabela 1.2), óleos e gorduras comestíveis são classificados em:

- Secativos: II = 130 a 200.
- Não-secativos: II < 100.
- Semi-secativos: II de valor intermediário.

eq. 1.33



Reagentes

- Solução de Wijs (monocloreto de iodo, ICl).
- Tiosulfato de sódio 0,1 N padronizado.
- Iodeto de potássio: 15,0 %.
- Solução de amido: 1,0 %.

Procedimento

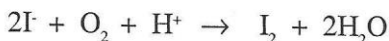
- Pesar (0,5 g)* de óleo e, ou, gordura em erlenmeyer de 250 ml com rolha esmerilada.
- Adicionar 15,0 ml de clorofórmio para dissolução da amostra.
- Acrescentar 25,0 ml da solução de Wijs.
- Arrolhar o frasco e agitar; deixar em repouso no escuro durante 30 min.
- Adicionar 20,0 ml de solução de KI.
- Finalmente, acrescentar 100,0 ml de água e titular com solução 0,1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, usando amido (1,0ml) como indicador até o desaparecimento da coloração azul.
- Preparar a amostra do branco, simultaneamente.

* Fundir a amostra, se for o caso. Filtrar em papel-filtro para remoção de impurezas e umidade. A quantidade da amostra recomendada, a ser pesada em função do índice de iodo, deve ser a seguinte:

Índice de iodo	Peso da amostra (g)
3,0	10,0
5,0	5,1 - 6,3
10,0	2,5 - 3,2
20,0	0,85 - 1,6
60,0	0,43 - 0,53
80,0	0,30 - 0,40
120,0	0,21 - 0,26
160,0	0,16 - 0,20

Fontes de erro

- Variação no peso da amostra.
- Variação nas condições da reação: tempo e temperatura.
- Deterioração do halogênio pela luz ou pelo oxigênio:



- Adição do halogênio na posição alfa da insaturação:



EXERCÍCIOS

1) Calcular o índice de iodo das seguintes amostras e discutir os resultados obtidos, comparando-os com os da literatura:

2) Calcular o índice de iodo do ácido araquidônico (PM = 304).

3) Calcular o índice de iodo da triaraquidonina (PM araquidônico = 304).

4) Calcular o índice de iodo do triglicerídio misto (palmitil-oleil-araquidonina) PM = 860.

Amostra	Peso (g)	ml Na ₂ S ₂ O ₃ (0,1057N)	(II) Calculado	(II) Literatura
Óleo de soja	0,2410	11,50	?	125-138
	0,2258	18,50		
Óleo de milho	0,2417	1,60	?	110-128
	0,2545	1,35		
Óleo de amendoim	0,3800	10,65	?	84-102
	0,4006	10,20		
Gord. hidrogenada	0,5804	14,65	?	
	0,5897	13,90		
Branco	-	34,50		
		34,65		

5) Uma amostra de 680 mg de óleo de oliva (PM médio = 884) absorveu 578 mg de I_2 . Calcular quantas duplas ligações em média estão presentes na molécula do triglicerídio e o índice de iodo deste óleo.

6) O II de uma amostra de manteiga é 68 e o IS é igual a 210, quantas ligações duplas em média estão presentes na molécula do triglicerídio.

7) Explicar as modificações ocorridas no óleo de milho, conforme os dados abaixo:

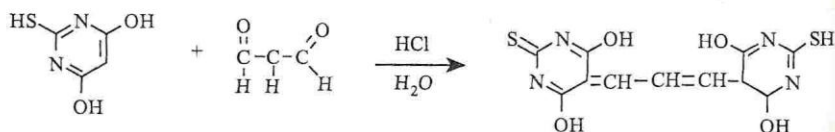
	Temperatura de oxidação (°C)			
	Óleo	120	160	200
Índice de iodo	122	105	102	100
Índice de peróxido	1,0	8,1	6,0	2,0
Índice de acidez	0,16	1,9	1,8	1,3
Índice de saponificação	186	198	198	200
Viscosidade (25 °C)	0,65	1,0	1,65	2,5

Índice de TBA – Ácido Tiobarbitúrico

É o método preferido para se detectar a oxidação de lipídios em sistemas biológicos, embora seja um procedimento empírico relacionado com a presença de aldeídos. O índice de TBA é expresso em miligramas de malonaldeído por quilo de amostra (número de TBA ou valor de TBA). O malonaldeído (dialdeído com três átomos de carbono) é obtido, em pequenas quantidades, da oxidação de lipídios polinsaturados quando aquecidos em meio ácido.

O teste fundamenta-se na formação de um complexo de coloração vermelha, resultante da condensação de dois mols de TBA com um mole de malonaldeído (eq. 1.34). Entretanto, diversos fatores podem afetar a intensidade da cor final do complexo.

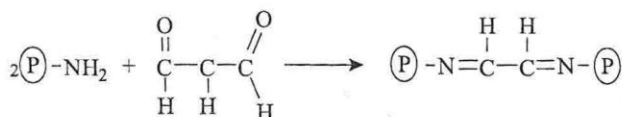
eq. 1.34



A reação não é específica, visto que vários produtos primários e secundários resultantes da oxidação de lipídios e outros componentes do alimento, como aldeídos, açúcares, proteínas, nitrito e compostos presentes na fumaça, interferem no teste, requerendo, portanto, correções em produtos curados e defumados.

Baixos valores podem ser erroneamente detectados, em face da interação co-valente do malonaldeído com os grupos amina livres presentes em proteínas (eq. 1.35). Por estas razões, o teste deve ser usado para medir a extensão geral da oxidação de lipídios em vez de quantificar o malonaldeído. Portanto, a terminologia “substâncias reativas com TBA” deve ser utilizada em substituição ao número de TBA ou valor de TBA.

eq. 1.35



A amostra contendo TBA é aquecida, e o produto da reação é medido fotometricamente a 532 nm. Durante o estágio de aquecimento, o qual é realizado em condições ácidas, o malonaldeído é liberado a partir do peróxido e reage com o ácido tiobarbitúrico (Figura 1.30). O teste pode ser realizado diretamente no produto, seguido da extração do pigmento colorido ou, alternativamente, a partir do destilado obtido.

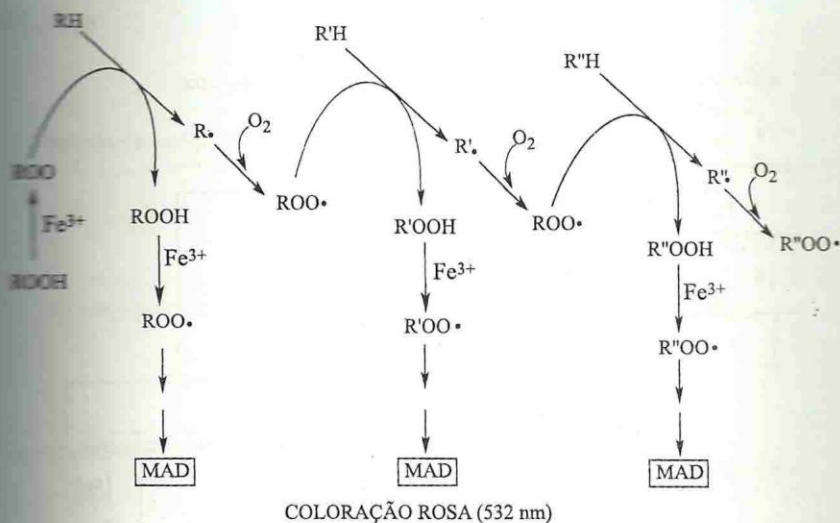
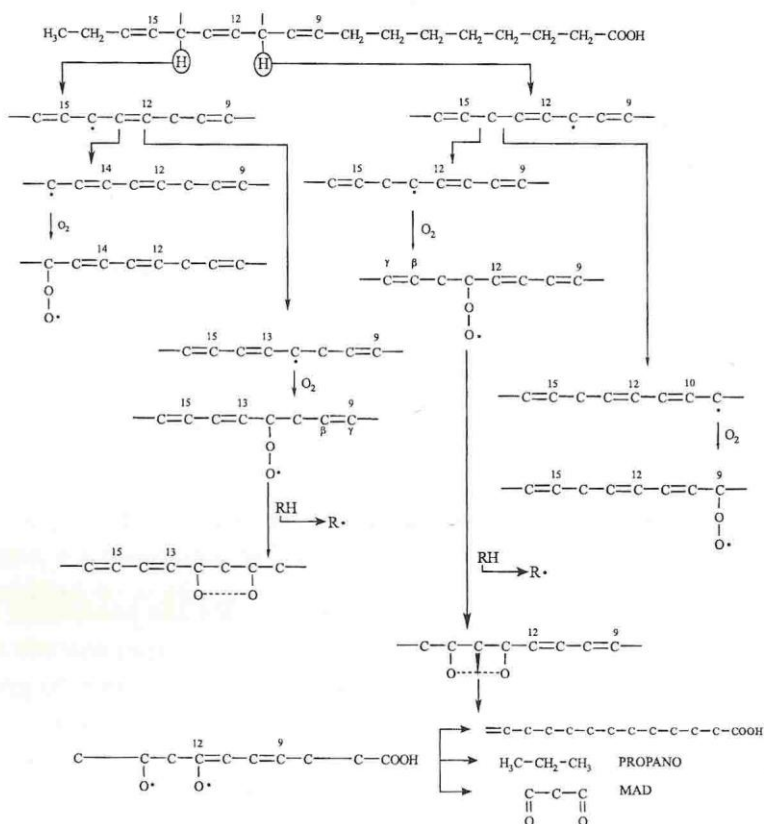


Figura 1.30 - Formação do malonaldeído (MAD).

De modo geral, substâncias reativas com TBA são produzidas em quantidades substanciais somente a partir de ácidos graxos contendo três ou mais insaturações. Isso porque as insaturações beta e gama do grupo peróxido resultante da oxidação podem ciclar-se, formando anel contendo cinco carbonos e, posteriormente, formando também malonaldeído (eq. 1.36a e b). Tal configuração está ausente nos radicais isoméricos oriundos do ácido linoléico.

Entretanto, pequenas quantidades de malonaldeído podem ser detectadas a partir de ácidos graxos com menos de três insaturações. Neste caso, a formação se deve à presença de outros aldeídos oriundos da decomposição do peróxido.

eq. 1.36a



Reagentes

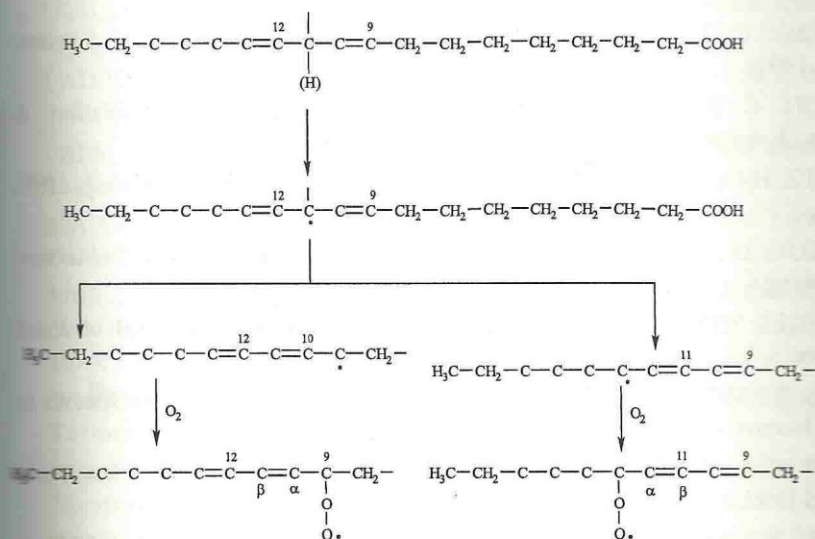
- HCl 4N.

- TBA: 0,2883% w/v em 90% de ácido acético glacial. Preparar antes do uso e manter no escuro.

- TEP: solução 10^{-3} M em água destilada (1,1,3,3 - tetraetoxipropano). Estável por uma semana em geladeira.

- CURVA-PADRÃO: preparar soluções apropriadas de TEP a partir da solução 10^3 M, variando a concentração de $1 \cdot 10^{-8}$ a $7 \cdot 10^{-8}$ mols de malonaldeído em 5,0 ml. Adicionar 2,0 ml de HCl e aquecer os tubos em água durante 5 min.

eq. 1.36b

**Procedimento**

- Pesar 10,0 g da amostra, adicionar 50,0 ml de água e homogeneizar por 2 min, em liquidificador.
- Transferir a mistura quantitativamente para o frasco de destilação, lavando com água (47,5 ml).
- Ajustar o pH para 1,2 - 1,5 com HCl 4 N (2,5 ml).
- Adicionar BHT (opcional), antiespumante e bolas de vidro.
- Destilar a amostra rapidamente (10 min) e coletar 50,0 ml.
- Combinar uma alíquota (5,0 ml) da amostra destilada com 5,0 ml do reagente TBA.
- Tampar o tubo, agitar e aquecer em água durante 35 min.
- Preparar o branco simultaneamente (5,0 ml de água + 5,0 ml do reagente TBA), resfriar os tubos em água/10 min e fazer a leitura da absorvância em 532 nm.

Obs.: O índice de TBA é expresso, convertendo-se a absorvância em mg de malonaldeído/1.000 g da amostra ($A \times 7,8$).

ANTIOXIDANTES

Introdução

A deterioração do alimento com o tempo, em razão de sua natureza biológica, é inevitável. Durante a produção, o processamento, a distribuição e o armazenamento ocorrem várias reações de deterioração envolvendo microrganismos e processos químicos. Estes últimos são representados pela oxidação enzimática e não-enzimática de lipídios e de substâncias fenólicas, promovendo alterações indesejáveis no *flavor*, na aparência, nas características físicas, no valor nutritivo e na formação de compostos tóxicos.

Durante a oxidação de ácidos graxos insaturados, via mecanismo de formação de radicais livres, os hidroperóxidos são os primeiros produtos formados, os quais se degradam, liberando novos radicais livres e promovendo a continuidade da oxidação do óleo e, ou, da gordura, além da formação de diferentes aldeídos voláteis (ranço). O efeito do antioxidante consiste na inativação dos radicais livres, na complexação de íons metálicos ou na redução dos hidroperóxidos para produtos incapazes de formarem radicais livres e produtos de decomposição rançosos.

A complexidade do processamento do alimento, associada à necessidade de aumentar o período de armazenamento, torna o produto vulnerável à deterioração oxidativa. Portanto, a utilização de substâncias químicas capazes de oferecer proteção contra a oxidação é necessária. A maioria dos alimentos que fazem parte da dieta humana possui certa quantidade de lipídios. Até mesmo a batata, que não é considerada alimento gorduroso, contém aproximadamente 0,1% de lipídios (membrana celular). Os alimentos de origem vegetal possuem, em sua

A velocidade da reação de auto-oxidação depende, em primeiro lugar, da composição do óleo ou da gordura, quanto à insaturação e tipos de ácidos graxos insaturados presentes. A temperatura apresenta efeito importante na velocidade da auto-oxidação e, mesmo em condições de congelamento, não previne completamente a reação. A luz acelera a oxidação, por isso a exposição de produtos em embalagens transparentes induz à reação. A remoção do oxigênio do alimento previne a oxidação, mas isto nem sempre é possível de ser conseguido na prática.

Metais em níveis-traço catalisam a reação e podem ser removidos pela utilização de complexantes como o ácido cítrico. As reações catalisadas pelas enzimas *lipases* (*ranço hidrolítico*) e *lipoxigenase*, naturalmente presentes nos tecidos animal e vegetal, não são inibidas pelo uso de antioxidantes. Estes devem ser adicionados ao produto o mais cedo possível, para se obter efeito máximo, visto que qualquer substância anteriormente formada permanece no produto.

Em várias situações, os lipídios encontram-se presentes no produto em pequenas quantidades, e a distribuição uniforme, de modo a garantir um bom contato, é pré-requisito para uma boa eficiência. Óleos e gorduras oxidados não serão revertidos pela adição de antioxidantes, e suas propriedades funcionais são variáveis. Alguns antioxidantes aumentam a proteção com o incremento da concentração; outros, acima do nível ótimo, possuem efeito pró-oxidante, enquanto ainda outros resistem ao tratamento térmico, ao vapor e ao efeito do pH no processamento do alimento, com conseqüente aumento da vida útil do produto.

Os procedimentos físicos utilizados na prevenção da oxidação incluem a refrigeração e embalagens a vácuo contendo agentes redutores. A refrigeração não é um método eficiente, visto que a solubilidade do oxigênio aumenta em baixas temperaturas. A moagem promove a liberação de catalisadores da oxidação, além de apresentar alta área de superfície de contato.

Escolha do Antioxidante

A maneira própria e efetiva da utilização do antioxidante depende do conhecimento de sua química, do seu modo de ação e da função no alimento. A diferença da atividade antioxidante está relacionada com sua

estrutura química, que influencia as propriedades físicas como *volatilidade, solubilidade e estabilidade térmica*. Além da relação *estrutura-função*, existem diversos fatores, como a natureza do lipídio, o estado físico do alimento, as condições de armazenamento e a atividade da água, que ditam a eficiência dos vários tipos de antioxidante. Por exemplo, o TBHQ e os ésteres do ácido gálico são úteis em situações em que ocorrem perdas do antioxidante por vaporização, secagem e vácuo, como o BHA e BHT.

As propriedades hidrofílico-lipofílicas dos vários antioxidantes também devem ser levadas em consideração. Em situação envolvendo lipídios com pequena relação área-volume, como ocorre em óleos, antioxidantes com o balanço hidrofílico-lipofílico elevado, como PG e, ou, TBHQ, são mais efetivos, pois concentram-se na superfície do óleo, onde a reação da gordura com o oxigênio é mais intensa. Já na situação que envolve lipídios com elevada relação área-volume, como os lipídios polares das membranas no tecido intacto e em emulsão óleo/água, em que ocorre elevada concentração de água, os antioxidantes lipofílicos, como BHA, BHT, galatos de alquila e tocoferóis, são mais efetivos.

Conforme a legislação, o antioxidante é considerado inócuo se preenchidas as seguintes condições: o LD_{50} não pode ser menor que 1.000 mg/kg de peso vivo e não apresentar efeitos significativos adversos no crescimento de animais experimentais em testes de longo prazo, em níveis de 100 vezes o proposto para o consumo humano.

Classificação dos antioxidantes

Existem duas categorias básicas de antioxidantes: *sintéticos e naturais*. Em geral, os antioxidantes sintéticos são estruturas fenólicas contendo variáveis graus de substitutos alquilas, enquanto os naturais são compostos fenólicos, quinonas, lactonas e os polifenóis. Diferentes mecanismos de controle da oxidação de lipídios estão envolvidos:

- bloqueadores da reação em cadeia (doadores de hidrogênio),
- complexadores com metais.

Os antioxidantes doadores de hidrogênio são adicionalmente classificados em dois grupos: *doadores e receptores de elétrons*. Os antioxidantes doadores de elétrons competem com o lipídio insaturado

pelo radical peroxil ($\text{ROO}^\bullet$), resultando na diminuição da velocidade da reação, a exemplo dos antioxidantes sintéticos. A eficiência desses é dependente da característica de sua estrutura química, incluindo a estabilidade do antioxidante radical formado, o qual é resultado das formas ressonantes e do impedimento estérico da hidroxila.

Já os antioxidantes receptores de elétrons competem com o oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$) pelo radical livre, reduzindo a formação do radical peroxil. A sua principal característica estrutural é a presença da quinona (tocoferilquinona), e a sua eficiência é atribuída à estabilidade e à presença de grupos que liberam elétrons presentes na posição orto do antioxidante.

O segundo mecanismo de atuação antioxidante envolve a *complexação de metais*, os quais catalisam a reação de oxidação de lipídios. Este mecanismo pode ser definido como preventivo, uma vez que não ocorre interação com as espécies radicais. Atuam complexando os íons metálicos, inibindo a decomposição de peróxidos e, conseqüentemente, formando radicais livres.

A oxidação de lipídios em tecidos biológicos inicialmente ocorre na fração lipídica presente na membrana celular em razão do seu alto grau de insaturação, acarretando alterações sensoriais que afetam a qualidade do produto, devido à formação de substâncias voláteis de baixo PM. Além disso, os radicais livres e os produtos secundários formados durante o processo oxidativo provocam a decomposição de outros componentes celulares, incluindo vitaminas, ácidos graxos essenciais e perdas das propriedades funcionais das proteínas.

Com base em suas funções, os antioxidantes são classificados como *primários* e *sinérgicos*.

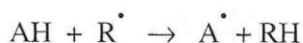
Antioxidantes primários

Os antioxidantes primários incluem os compostos fenólicos poliidroxilados (galatos) e os fenóis com impedimento estrutural (BHA, BHT, TBHQ e tocoferóis). Atuam bloqueando a ação dos radicais livres, convertendo-os em produtos estáveis por meio da doação de hidrogênio ou elétrons, além de atuarem nas reações com os radicais lipídicos, formando o complexo *antioxidante-lipídio*. Esquematicamente, podem ser representados da seguinte forma: inibição da fase inicial da reação

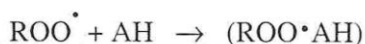
pela interação com os radicais livres ou na etapa de propagação, reagindo com os radicais alcóxil ou peróxil, e, ou, pela formação do complexo antioxidante-peróxil, conforme descrito a seguir.

Mecanismo de ação

O antioxidante (AH) funciona removendo os radicais livres ($R^\bullet$ ou $ROO^\bullet$) tão logo estes sejam formados; portanto, são eficientes apenas quando a concentração do $ROO^\bullet$ é baixa, ou seja, na fase inicial da oxidação. Logo que os radicais peróxil estejam presentes em concentrações elevadas (fase de propagação), o antioxidante é rapidamente decomposto. A reação direta do antioxidante com o substrato $R^\bullet$ parece ser menos importante que a reação com o radical peróxil ($ROO^\bullet$):



Outro mecanismo é a formação do complexo entre o radical peróxil e o antioxidante; o complexo formado ($ROO \cdot AH$) pode então reagir com outro radical adicional:



Para ser efetivo, o antioxidante tem de competir com o substrato (lipídio insaturado), normalmente presente em concentrações elevadas. A inibição da auto-oxidação dos lipídios ocorre de duas maneiras:

a) O antioxidante transfere átomos de hidrogênio para o radical peróxil. Cumprindo esta função, radicais livres oriundos das moléculas do antioxidante são formados, mas sua estrutura é tal que estes radicais são relativamente estáveis e não possuem energia suficiente para reagir com o lipídio.

b) O radical fenóxil resultante do antioxidante interage com um segundo radical peróxil via interação entre radicais, formando a peroxidienona. Entretanto, a formação da peroxidienona oriunda da reação entre o radical fenóxil e o radical livre pode limitar a eficiência

face do impedimento molecular causado pela cadeia lateral, torna-se difícil para estes antioxidantes reagirem com os radicais peroxil. Por esta razão, são considerados antioxidantes fracos e devem ser utilizados em mistura com outros para se obter o efeito sinérgico. Por outro lado, o propil galato é muito eficiente, porque contém três hidroxilas, não apresentando impedimento estrutural como ocorre com o BHA e BHT.

A equação 2.1 ilustra a deslocalização (estabilização) do elétron solitário, deixado após a remoção do hidrogênio no anel aromático do antioxidante. Reações adicionais dos antioxidantes radicais são complexas e terminam com a formação de diferentes produtos, muitos dos quais de natureza dimérica.

Antioxidantes sinérgicos

São classificados de forma genérica como *removedores de oxigênio* e *complexantes*. Os sinérgicos funcionam por vários mecanismos. Podem atuar na regeneração do radical fenoxil, doando hidrogênio e, conseqüentemente, regenerando o antioxidante primário. Dessa forma, o antioxidante fenólico pode ser utilizado em baixas concentrações se o sinérgico é simultaneamente adicionado ao alimento. Por exemplo, o ácido ascórbico e o palmitato de ascorbila atuam como sinérgicos para os antioxidantes primários.

Os *removedores de oxigênio* (Tabela 2.1), como ácido ascórbico, palmitato de ascorbila, sulfito e eritorbatos, reagem com o oxigênio livre, removendo-o do sistema fechado, isto é, em situação na qual o oxigênio se encontra em quantidade limitada. O ácido ascórbico reage diretamente com o oxigênio, formando o deidroácido ascórbico e eliminando o suprimento do oxigênio disponível para a reação de auto-oxidação. Em razão disso, o ácido ascórbico é muito utilizado em bebidas à base de suco de frutas, cerveja e produtos enlatados ou engarrafados contendo espaço livre (3,3 mg de ácido ascórbico consomem o oxigênio em 1,0 ml de ar). O ácido eritórbito é oxidado mais rapidamente que o ácido ascórbico. O palmitato de ascorbila é

mais eficaz no controle da degradação oxidativa de produtos gordurosos, devido à sua maior solubilidade na fração lipídica.

Tabela 2.1 - Propriedades física e química dos ascorbatos

Forma	PM	Enediol* equiv.	Sol. H ₂ O mg/ml	Sol. óleo mg/ml	Sol. EtOH mg/ml
Ácido ascórbico	176,13	1,0	330	<1	<1
Ascorbato de sódio	198,11	1,12	770	<1	<1
Ascorbato de cálcio	426,35	1,21	500	<1	<1
Ascorbato de potássio	194,11	1,1	980	<1	<1
Palmitato de ascorbila	414,54	2,35	0,02	3	120

*(-COH=COH-): utilizado para calcular o equivalente em vit. C. Por exemplo, 1,12 g de ascorbato de sódio possui a mesma vitamina C equivalente a 1,0 g ácido ascórbico.

Os *agentes complexantes* imobilizam íons metálicos, aumentando significativamente a energia de ativação das reações iniciais da auto-oxidação. A utilização de complexantes como ácido cítrico, EDTA e derivados do ácido fosfórico prolongam a vida útil do alimento; eles não são considerados antioxidantes, mas efetivos sinergistas tanto para os antioxidantes primários como para os removedores de oxigênio. O par de elétrons não-pareados na sua estrutura molecular promove a ação complexante por meio da formação de complexos estáveis com os metais pró-oxidantes como ferro e cobre.

Como descrito, os sinergistas, de modo geral, aumentam a vida útil dos antioxidantes primários, e o efeito obtido da mistura no controle da oxidação é maior que quando utilizados isoladamente.

Característica dos Antioxidantes Primários

Em alimentos, os antioxidantes fenólicos sintéticos de uso permitido restringem-se a quatro tipos (Figura 2.2). A escolha dos diferentes tipos é determinada unicamente com base nos requerimentos tecnológicos. Combinações entre alguns tipos em geral oferecem melhores resultados que cada tipo isoladamente, o que é denominado *sinergismo*, cujo mecanismo é ainda desconhecido.

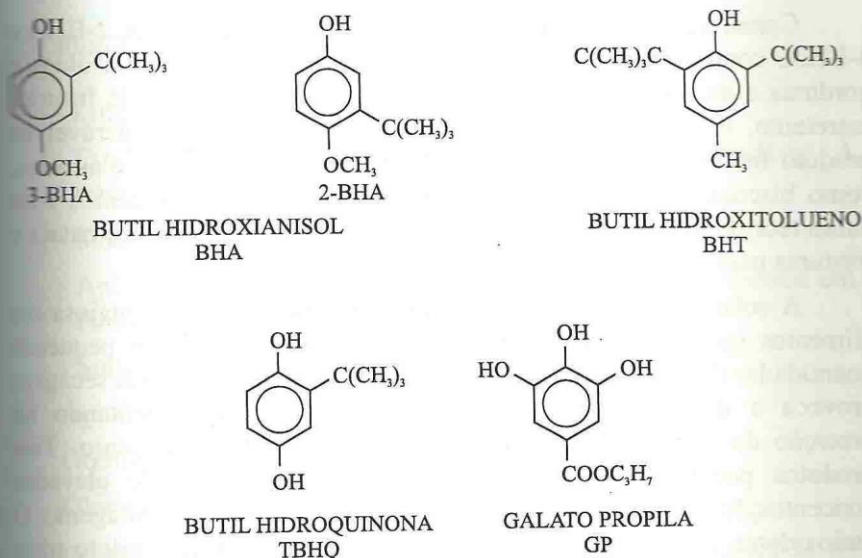


Figura 2.2 - Antioxidantes sintéticos solúveis em óleo.

Quando se utiliza somente um tipo de antioxidante, sua concentração não pode ultrapassar 0,01% (100 ppm), com base no teor de óleo e, ou, gordura no alimento. Quando mais de um tipo é utilizado, o total não pode exceder a 0,02% (200 ppm) e nenhum dos antioxidantes pode ultrapassar 0,01%.

Butil hidroxianisol (BHA)

- Limite máximo permitido: 100 ppm.
- Estabilidade térmica: muito boa, mas em temperaturas elevadas confere odor desagradável.
- Sinergismo: BHT e GP.
- Aplicação: eficiente em gordura animal e de pouca eficiência em óleos vegetais.
- Solubilidade (% p/v):
 - Água = zero;
 - Gordura animal = 30,0 a 40,0; e
 - Óleo vegetal = 40,0.

Comercialmente, o BHA é uma mistura de dois isômeros, 2-BHA e 3-BHA, contendo 90% do 3-isômero. É altamente solúvel em óleos e gorduras e insolúvel em água. É vaporizado em temperatura de frituras; entretanto, o resíduo de BHA ainda confere proteção considerável ao produto final (propriedade *carry-through*) em produtos fritos e assados, como biscoitos, batata frita, amendoim torrado etc. Em alimentos com baixo teor de gordura, como produtos à base de cereais, purê de batata e misturas para bolos, o BHA é muito utilizado.

A volatilidade do BHA e do BHT é uma propriedade vantajosa em alimentos que contêm baixo teor de gordura. A adição de pequenas quantidades do BHA ou BHT ao produto antes do cozimento ou secagem provoca a dispersão pela volatilização ou destilação, resultando na proteção do produto durante o processamento e armazenamento. Tais produtos podem também ser estabilizados pela adição de elevadas concentrações do antioxidante na parede interna das embalagens. O antioxidante entra em contato com a porção gordurosa do produto mais eficientemente por volatilização.

Utilização

O BHA é muito utilizado em diversos produtos, como óleos, gorduras, alimentos contendo gordura, e em embalagens. O efeito antioxidante do 3-isômero é maior que o 2-isômero. O BHA funciona sinergisticamente com galatos, tocoferóis, BHT, TBHQ e ácido cítrico. A Tabela 2.2 apresenta os níveis utilizados na prática em produtos alimentícios.

Tabela 2.2 - Níveis de BHA utilizados em produtos alimentícios^a

Produto	Nível (%)
Gordura animal	0,001 - 0,01
Óleos vegetais	0,002 - 0,02
Produtos de confeitaria	0,01 - 0,04
Cereais	0,005 - 0,02
Purê de batata desidratada	0,001
Óleos essenciais	0,01 - 0,1
Chocolate	> 0,1
Embalagens	0,02 - 0,1

^aCombinações com BHT, galatos e ácido cítrico são frequentemente utilizadas.

Butil hidroxitolueno (BHT)

- Limite máximo permitido: 100 ppm.
- Estabilidade térmica: razoável, com odor desagradável à temperatura elevada.
- Sinergismo: BHA.
- Aplicação: eficiente em gordura animal e de pouca eficiência em óleos vegetais.
- Solubilidade (% p/v):

Água = zero;

Gordura animal = 20,0 a 30,0; e

Óleo vegetal = 20,0 a 30,0.

O BHT é muito utilizado e possui propriedades similares às do BHA. Entretanto, ele não é tão efetivo como o BHA, em razão da presença de dois grupos butil, os quais conferem maior impedimento estérico que o BHA, além de ser vaporizado mais facilmente durante aquecimento; portanto, o BHT possui efeito protetor menor que o BHA (propriedade *carry-through*: habilidade de um antioxidante de sobreviver a processos tecnológicos, principalmente aquecimento, e transferir a atividade estabilizante para o produto final).

Utilização

Pelo seu comportamento parecido com o do BHA, em relação às suas propriedades antioxidantes, o BHT é utilizado de forma similar. Entretanto, ele é menos efetivo que o BHA, além de possuir efeito *carry-through* menor. Funciona sinergisticamente com BHA (Figura 2.3), TBHQ e ácido cítrico e não apresenta efeito sinérgico com o galato de propila.

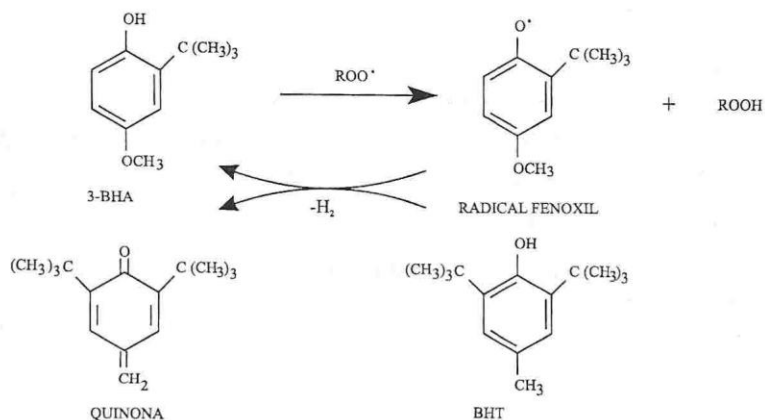


Figura 2.3 - Sinergismo entre o BHA e BHT.

A Tabela 2.3 apresenta os níveis utilizados em produtos alimentícios. Tal como o BHA, o BHT é pouco eficiente em óleos vegetais. Confere baixa proteção para os óleos e gorduras submetidos a frituras, mas contribui com o efeito *carry-through* dos produtos fritos. O BHT é mais efetivo que o BHA na estabilização de gorduras animais.

Tabela 2.3 - Níveis de BHT utilizados em produtos alimentícios^a

Produto	Nível (%)
Gordura animal	0,001 - 0,01
Óleos vegetais	0,002 - 0,02
Produtos assados	0,01 - 0,04
Cereais	0,005 - 0,02
Purê de batata desidratada	0,001
Óleos essenciais	0,01 - 0,1
Embalagem	0,02 - 0,1

^aCombinações com BHA, galatos e ácido cítrico são frequentemente utilizadas.

Ésteres do ácido gálico

- Limite máximo permitido: 100 ppm.
- Estabilidade térmica: ruim (decompõe acima de 148 °C).

- Sinergismo: BHA.
- Aplicação: eficiente em gordura animal e óleos vegetais, mas em presença de ferro forma complexo de coloração violeta.
- Solubilidade (% p/v):
Água = 0,35;
Gordura animal = 1,0; e
Óleo vegetal = 1,0.

Os galatos utilizados como antioxidantes para alimentos incluem os ésteres do ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxibenzóico) *propila*, *octila* e *dodecila* (Figura 2.2). Dos três, o galato de propila é o mais utilizado e eficiente. É menos solúvel em óleo e gordura que o BHA e BHT e apresenta significativa solubilidade em água. Os ésteres dodecila e octila são mais solúveis em óleo e gordura que o galato de propila.

Em geral, os galatos não possuem significativo efeito *carry-through* (estabilidade do antioxidante em resistir em temperatura elevada utilizada no processamento). Dos três galatos, o galato de propila é o mais sensível ao aquecimento e se degrada em temperatura de fritura. A estabilidade à temperatura melhora com o aumento do PM; octila e dodecila são mais estáveis ao calor e apresentam melhores propriedades de *carry-through*.

O galato de propila também forma complexos de coloração violeta com o íon ferro, resultando na descoloração do produto. Portanto, é sempre utilizado em combinação com complexantes, como o ácido cítrico. Esta descoloração não é problema quando se utilizam os galatos de octila ou dodecila (insolúveis em água).

Utilização

Os galatos são antioxidantes extremamente efetivos, especialmente na estabilização de óleos e gorduras anidra. As atividades antioxidantes dos três ésteres são idênticas. Atuam sinergisticamente com BHA, tocoferóis e TBHQ. A Tabela 2.4 apresenta os níveis de galatos comumente utilizados em produtos alimentícios.

Tabela 2.4 - Níveis de galatos utilizados em vários produtos alimentícios^a

Produto	Níveis (%)
Gordura animal	0,001 - 0,01 galatos
Óleos vegetais	0,001 - 0,02 galatos
Leite em pó integral	0,005 - 0,01 galato de dodecila
Margarina	0,001 - 0,01 galatos
Produtos de confeitaria	0,01 - 0,04 galato de dodecila
Cereais	0,003 galatos
Balas	0,01 galatos

^a Combinações com BHA, BHT e ácido cítrico são freqüentemente utilizadas.

Butil hidroquinona (TBHQ)

- Limite máximo permitido: 100 ppm.
- Estabilidade térmica: boa.
- Aplicação: eficiente em óleos vegetais.
- Solubilidade (% p/v):

Água = 1,0;

Gordura animal = 5,0 a 10; e

Óleo vegetal = 5,0.

O TBHQ é muito efetivo na estabilização de óleos e gorduras, especialmente em óleos vegetais polinsaturados bruto e refinado. Os dois grupos hidroxila na posição *para* são os responsáveis pela atividade antioxidante. É estável em temperatura elevada e menos volátil que o BHA e BHT, sendo considerado o melhor antioxidante de óleos para frituras e do produto frito. É ligeiramente solúvel em água e não forma complexos coloridos com metais.

Utilização

A atividade do TBHQ é equivalente ou maior que a do BHA, BHT ou GP. A sua característica de solubilidade é similar à do BHA e superior à do BHT e GP. Não possui efeito *carry-through* em produtos assados.

Tabela 2.5 - Conteúdo aproximado de tocoferóis em alguns produtos (mg/kg)

Produto	Tocoferóis			
	α	β	γ	δ
Coco	5 - 10	-	5	5
Algodão	40 - 560	-	270 - 410	-
Milho (grão)	60 - 260	-	400 - 900	1 - 50
Milho (germe)	300 - 430	1 - 20	450 - 790	5 - 60
Oliva	1 - 240	-	-	-
Dendê	180 - 260	-	320	70
Amendoim	80 - 330	-	130 - 590	10 - 20
Soja	30 - 120	0 - 20	250 - 930	50 - 450
Girassol	350 - 700	20 - 40	10 - 50	1 - 10
Germe de trigo	560 - 1200	660 - 810	260	270
Manteiga	10 - 33			
Ovo	5 - 11			
Leite	0,2 - 1,1			
Carne (boi)	6			
Frango	4			
Porco	5			
Banha	12			

De modo geral, pouco benefício se tem com a adição de tocoferol em óleos vegetais com a finalidade de melhorar a estabilidade, em razão das diferenças na composição de ácidos graxos dos variados tipos de óleos, requerendo, portanto, níveis diferenciados de tocoferóis para se obter boa estabilização. Em condições de armazenamento de alimento, os tocoferóis, como outros compostos fenólicos, inibem a oxidação de óleos comestíveis, mas a sua ação é mais pronunciada em gordura animal, especialmente na presença de sinergistas.

Todos apresentam atividade antioxidante e de vitamina E; entretanto, possuem limitado efeito *carry-through* e são menos efetivos que o BHA, BHT e galato de propila. A atividade antioxidante varia em função da temperatura e do grau do impedimento estérico. Em condições fisiológicas, ou seja, 37 °C, a

atividade antioxidante é da seguinte ordem: $\alpha > \beta > \gamma > \delta$, similar à atividade biológica. Com temperatura elevada, entre 50 e 100 °C, a atividade antioxidante na ordem inversa é observada: $\delta > \gamma > \beta > \alpha$. O α -tocoferol é o mais abundante dos tocoferóis, e sua atividade biológica é duas vezes mais que o β e γ e 100 vezes o δ .

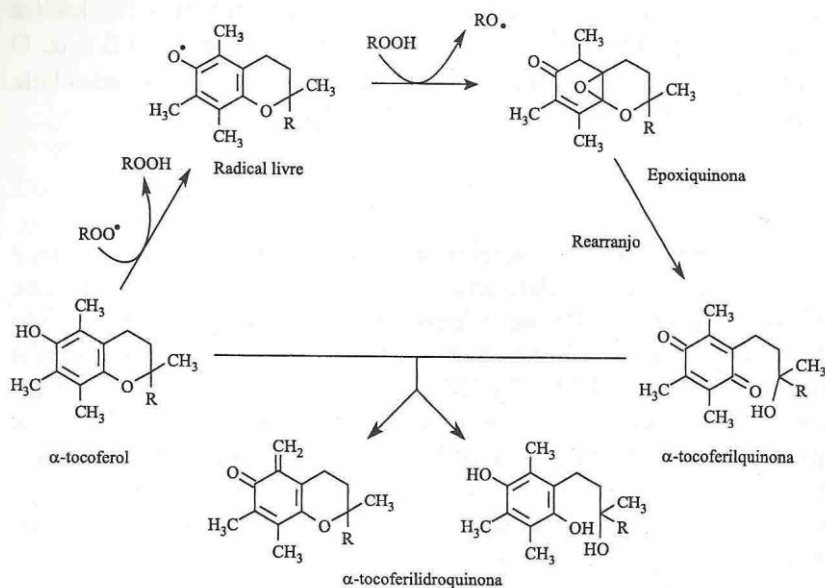
Utilização

Os tocoferóis são os principais antioxidantes naturais em vegetais e gordura animal. São relativamente fracos antioxidantes quando comparados com os antioxidantes fenólicos sintéticos e possuem limitado efeito *carry-through*. Funcionam sinergisticamente com outros antioxidantes, como BHA, TBHQ, palmitato de ascorbila e ácido ascórbico. São efetivos em combinação com outros antioxidantes ou sinergistas, como palmitato de ascorbila, ácido ascórbico e ácido cítrico. Por exemplo, a vida de prateleira da banha pode ser duplicada pela adição da mistura contendo α -tocoferol (0,001%), palmitato de ascorbila (0,00025%) e ácido cítrico (0,0005%).

Como todos os antioxidantes fenólicos, os tocoferóis exercem sua atividade antioxidante competindo com o triglicerídio pelos radicais peróxil (eq. 2.2). O α -tocoferol radical formado é estável em razão da deslocalização do elétron não-pareado, portanto menos reativo que o radical peróxil. O α -tocoferol radical pode interagir com outro radical peróxil formando tocoferilquinona ou pode interagir com outro radical α -tocoferil para formar tocoferilquinona regenerando o tocoferol. A interação do alfa-tocoferol com radicais livres oriundos da oxidação de lipídios tem como consequência a formação de quinona, e cada molécula de tocoferol consome dois radicais peróxil.

O gamatocoferol é mais efetivo que o alfatocoferol em face da maior estabilidade dos radicais livres formados em contato com o lipídio oxidado, e os radicais livres formados do sigmatocoferol são ainda mais estáveis. A atividade antioxidante é inversamente proporcional à meia-vida dos respectivos radicais livres; portanto, a ordem de atividade é a seguinte: *alfa* < *beta* < *gama* < *sigma*. Assim, durante o armazenamento de óleos vegetais comestíveis, o alfatocoferol se decompõe mais rápido que o gama e o sigmatocoferol.

eq. 2.2



Em sistema biológico, o ascorbato recicla o α -tocopherol reduzindo o α -tocopherol radical. Em certas condições, o tocoferol pode atuar como pró-oxidante em situação em que a concentração de lipídios excede muito a concentração de tocoferol. A oxidação progressiva acarreta a destruição do tocoferol do meio causando acúmulo de $ROOH$, estimulando a reação de propagação.

Durante a refrigeração de carnes pré-cozidas ocorrem a perda do aroma característico e o aparecimento de *flavor* estranho (oxidado/rançoso/azedo), comumente denominado *warmed-over flavor* – *WOF* (*flavor* requentado), no período de 1-3 dias. A oxidação dos fosfolipídios da membrana e a degradação de proteínas e de compostos associados com o aroma da carne "fresca" cozida são os responsáveis pela formação do sabor desagradável. O aquecimento libera o ferro da mioglobina e de outras metaloproteínas que atuam como catalisadores, acelerando a reação da oxidação de fosfolipídios, transforma a mioglobina em molécula pró-oxidante, induz a decomposição de peróxido e desnatura enzimas protetoras que atuam no controle da oxidação.

A sensibilidade de produtos de carne pré-cozida à oxidação de lipídios depende de diversos fatores. Diferença entre os vários tipos de carne pode ser explicada pela diferença de concentração de ácido graxo polinsaturado, ferro e alfatocopherol, dentre outros antioxidantes. As carnes de peru e de frango oxidam rapidamente em razão da alta concentração de ácidos graxos polinsaturados. A carne escura é ainda mais sensível em face do alto teor de fosfolipídios e ferro. A carne de peru oxida mais rapidamente que a de frango, pois contém baixos níveis de alfatocopherol.

Vários antioxidantes (Tabela 2.6) efetivamente retardam o aumento dos níveis de substâncias reativas com TBA (Capítulo 1), mantendo sensorialmente aceitável o produto.

Tabela 2.6 - Efeito da adição de antioxidantes na estabilidade oxidativa da carne cozida

Antioxidante*	Produto	Armazenamento	TBA**
Alfatocopherol			
0,02%	Carne porco moída	4 °C/7 dias	0%
0,02%	Carne boi moída	4 °C/2 dias	+
0,02%	Carne peixe moída	4 °C/7 dias	+
Sigmatocopherol			
0,05%	Carne boi moída	4 °C/6 dias	90%
Mistura de Tocoferóis			
0,02%	Lingüiça frango e porco	4 °C/18 dias	80%
L-Ascorbatos			
0,02%	Carne peixe moída	4 °C/7 dias	+
0,02%	Carne boi moída	4 °C/2 dias	+
Outros Antioxidantes			
Ácido fítico (0,05%)	Peito frango	4 °C/22 dias	40%
Flavonóides (0,02%)	Carne peixe moída	4 °C/7 dias	40-90%
Polifenóis (0,02%)	Carne peixe moída	4 °C/7 dias	95%
Especiarias			
Alecrim (0,04%)	Carne porco moída	4 °C/5 dias	32%
Alecrim (0,05%)	Carne porco moída	5 °C/10 dias	20%
Oleores. de alecrim (0,02%)	Ling. frango e porco	4 °C/18 dias	72%
Cebola (1%)	Carne boi moída	6 °C/8 dias	49%
Mostarda moída (0,5%-2%)	Carne porco moída	4 °C/21 dias	20-95%

* = Concentração baseada no peso total.

**| = O símbolo (+) significa que não ocorreu inibição no aparecimento do flavor estranho, e a % indica a redução do número de TBA.

Característica dos Antioxidantes Sinérgicos

São os removedores de oxigênio e agentes complexantes.

Removedores de oxigênio

Ácido ascórbico

Tanto o ácido ascórbico como o ascorbato de sódio são utilizados na remoção do oxigênio e como sinérgicos em diversos produtos alimentícios.

Utilização

O ácido ascórbico é utilizado como antioxidante em diversos produtos, como frutas e vegetais processados, carne, peixe, derivados do leite, bebidas etc. A Tabela 2.7 apresenta os níveis comumente utilizados. O ácido ascórbico, como antioxidante em alimentos, funciona de diversas maneiras: na remoção do oxigênio, prevenindo, portanto, a oxidação de constituintes sensíveis do alimento, e na regeneração de antioxidantes, além de atuar sinérgicamente com os agentes complexantes e, ou, na redução de produtos indesejáveis da oxidação. Em tais situações, o ácido ascórbico é oxidado para deidroácido ascórbico.

O ácido ascórbico funciona sinérgicamente com os antioxidantes fenólicos sintéticos, como BHA, GP e tocoferóis, retardando a oxidação de óleos, gorduras, manteiga e margarina. Na ausência de antioxidantes fenólicos e na presença de cobre, o ácido ascórbico atua como pró-oxidante em banha, manteiga e creme congelado, por meio da formação do complexo cobre-ácido ascórbico. Por exemplo, a adição de 200-250 mg de ácido ascórbico e 100 mg de citrato de sódio por litro de leite antes da secagem protege lipídios, *flavor* e vitaminas A e D durante o armazenamento.

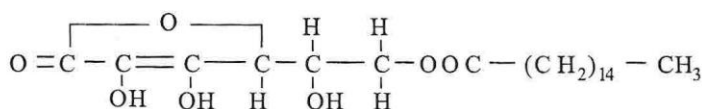
Tabela 2.7 - Níveis de ácido ascórbico utilizados em produtos alimentícios

Produto	Nível (%)
Suco de frutas	0,005 - 0,02
Refrigerantes	0,005 - 0,03
Óleo essencial	0,01
Vinho	0,005 - 0,015
Cerveja	0,002 - 0,006
Frutas congeladas	0,03 - 0,045
Frutas enlatadas	0,025 - 0,04
Vegetais enlatados	0,1
Carne curada	0,02 - 0,05
Leite em pó	0,02 - 0,2

Palmitato de ascorbila

O ácido ascórbico e seus sais são virtualmente insolúveis em óleos e gorduras, não sendo, conseqüentemente, utilizados como antioxidantes nesse meio. Por serem solúveis em água, eles são utilizados como antioxidantes em produtos como cerveja, refrigerantes e sucos.

O palmitato de ascorbila (Figura 2.5) é sintetizado a partir do ácido ascórbico e do ácido palmítico, mas a sua solubilidade em óleos é muito pequena em comparação com os outros tipos de antioxidantes. Para se obter boa dissolução, é necessário o uso de temperaturas altas e de agentes solubilizantes, como monoglicerídios. O seu efeito antioxidante se verifica pela capacidade sequestrante; raramente é utilizado de forma isolada, mas, em geral, em formulação contendo tocoferóis. É eficaz removedor de oxigênio e sinergista. É mais solúvel em óleos que o ácido ascórbico; entretanto, sua solubilidade é baixa, comparada com a de outros antioxidantes.



Solubilidade (% p/v)

Água: 0,2

Etanol: 22

Óleo vegetal: 0,03 - 0,1

Figura 2.5- Estrutura do palmitato de ascorbila.

Utilização

O palmitato de ascorbila funciona sinergisticamente com outros antioxidantes, especialmente com tocoferóis. A Tabela 2.8 apresenta os níveis comumente utilizados em produtos alimentícios. Ele é muito efetivo em mistura sinérgica com tocoferóis, ácido cítrico, galato de octila na proteção de gordura animal, óleos vegetais, carotenóide, óleo essencial e produtos de confeitaria. O palmitato de ascorbila é muito eficiente tanto na proteção de óleos e gorduras submetidos a longos processos de frituras quanto na estabilidade do produto final.

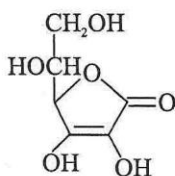
Tabela 2.8 - Níveis de palmitato de ascorbila utilizados em produtos alimentícios

Produto	Nível (%)
Gordura animal	0,01 - 0,02
Óleos vegetais	0,01 - 0,02
Manteiga	0,001 - 0,02
Leite em pó integral	0,01 - 0,05

Ácido eritórbito

O ácido eritórbito (eq. 2.3) e o sal de sódio são fortes agentes redutores e atuam na redução do oxigênio molecular. O ácido eritórbito é o isômero D do ácido ascórbico, portanto não apresenta atividade biológica e não ocorre naturalmente em alimentos.

eq. 2.3



A combinação do ácido eritórbito com ácido cítrico tem sido utilizada em substituição ao sulfito no controle da rancidez e descoloração em peixes congelados, salada de vegetais e frutas congeladas. A Tabela 2.9 apresenta os níveis comumente utilizados em produtos alimentícios. Em comparação com a do ácido ascórbico, a atividade antioxidante do ácido eritórbito é menor, particularmente em condições envolvendo aquecimento. Oxida mais rapidamente que o ácido ascórbico no alimento.

Tabela 2.9 - Níveis do ácido eritórbito utilizados em produtos alimentícios

Produto	Nível (%)
Suco de frutas	0,005 - 0,02
Cerveja	0,002 - 0,006
Frutas congeladas	0,03 - 0,045
Frutas enlatadas	0,025 - 0,04
Carne curada	0,02 - 0,05

Agentes complexantes

Traços de metais ocorrem naturalmente em todos os alimentos e em quantidades variáveis na água. Os agentes complexantes, também denominados seqüestrantes, possuem habilidade de se ligarem a estes metais formando estrutura estável. Certos problemas, particularmente como a descoloração e sabor estranho em alimentos, em razão da presença de íons em quantidades traços, podem ser eliminados pela adição do complexante.

Os antioxidantes funcionam melhor na presença de sequestrantes ou agentes complexantes, os quais inativam os íons metálicos iniciadores dos estádios iniciais da oxidação. Atuam na complexação dos metais formando estrutura de anel em volta do íon metálico. O sítio reativo do íon é então bloqueado, portanto não participa da reação. Os complexantes mais comuns utilizados em alimentos são: *ácido etileno diamino tetraacético (EDTA) e seus sais de cálcio e sódio, lecitina, ácido cítrico e citrato, ácido fosfórico e fosfatos e, ácido tartárico.*

Ácido fosfórico e fosfatos

O ácido fosfórico e seus derivados são muito utilizados na indústria de alimentos (Tabela 2.10) como agentes complexantes, antimicrobianos e estabilizadores de emulsão. Por conveniência, são classificados em *ortofosfatos* e *fosfatos condensados*, constituídos de polifosfatos e metafosfatos. O ácido fosfórico funciona também como sinergista com os antioxidantes primários em óleos vegetais. Os fosfatos utilizados como complexantes incluem ortofosfatos de *sódio* e *potássio* (Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 / K_2HPO_4 / KHPO_4), *pirofosfatos* ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ / $\text{Na}_2\text{P}_2\text{H}_2\text{O}_7$), *tripolifosfato de sódio* ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) e *sódio polifosfatos* (NaPO_3)_{n=4-15}, dos quais os pirofosfatos e tripolifosfatos são os mais efetivos. Os fosfatos formam complexos estáveis solúveis com íons metálicos como cobre, ferro e níquel.

Utilização

Os fosfatos são muito efetivos como agentes complexantes e utilizados na preservação de frutas e vegetais, derivados do leite, derivados de carne e peixes. Atuam como sinergistas com BHA, BHT e GP na estabilização de óleos e gorduras.

A combinação de polifosfato de sódio com o ácido ascórbico ou α -tocoferol é efetiva na estabilização do *flavor* em creme de leite esterilizado; os fosfatos são eficientes no controle da oxidação da manteiga; e o hexametáfosfato de sódio é eficiente na inibição da descoloração oriunda da reação de Maillard em leite condensado açucarado.

Tabela 2.10 - Fosfatos utilizados em alimentos

Nome químico	Fórmula	pH (1% solução)
<i>Ortofosfatos</i>		
- Ácido fosfórico	H_3PO_4	1,6
- Monofosfato de sódio monobásico	NaH_2PO_4	4,6
- Monofosfato de sódio dibásico	Na_2HPO_4	9,0
- Bifosfato de cálcio monobásico	$Ca(H_2PO_4)_2$	4,6
- Fosfato de cálcio dibásico	$CaHPO_4 \cdot H_2O$	7,5
- Fosfato de cálcio tribásico	$Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6$	7,3
- Fosfato de amônio monobásico	$NH_4H_2PO_4$	4,6
- Fosfato de amônio dibásico	$(NH_4)_2HPO_4$	8,0
- Fosfato de potássio monobásico	KH_2PO_4	4,6
- Fosfato de potássio tribásico	K_3PO_4	11,5
- Fosfato de alumínio e sódio	$Na_3Al_2H_{15}(PO_4)_8$	3,4
<i>Polifosfatos</i>		
- Pirofosfato de sódio	$Na_2H_2P_2O_7$	4,5
- Tripolifosfato de sódio	$Na_5P_3O_{10}$	9,8
- Hexametáfosfato de sódio	Mistura de cadeias de vários comprimentos	6,9

A utilização do pirofosfato de sódio tribásico aumenta a vida útil de vegetais desidratados, quando imerso em solução antes do branqueamento e da secagem. Os polifosfatos são eficazes na preservação da cor vermelha natural de tomate, *ketchup* e sucos. O pirofosfato ácido de sódio controla o escurecimento em batata após o cozimento; em maçã fatiada, os fosfatos controlam o escurecimento, além de preservar sua textura e *flavor*.

Na indústria de carne, o fosfato é muito utilizado na retenção da cor e no controle do desenvolvimento de sabor estranho. Em pH na faixa de 6,5-6,8, ele retarda a oxidação da oximioglobina para a forma castanha metmioglobina; e preserva a cor e o *flavor* de produtos à base de peixe e

frango *in natura* cozido ou refrigerado. Em combinação com o ácido ascórbico, é eficaz no controle da rancidez oxidativa em carne pré-cozida.

Os fosfatos também são utilizados no processamento de queijo. Eles auxiliam na estabilização da emulsão manteiga-proteína-água e atuam sequestrando os íons de cálcio da *para-k-caseína*, ocasionando novo rearranjo e conseqüente exposição de grupos polar e apolar da proteína do leite. Além do efeito sequestrante, os ânions participam de ligações iônicas entre as moléculas de proteína, estabilizando a matriz e retendo as gorduras, resultando no produto com textura uniforme desejável. Os fosfatos utilizados para este propósito são os ortofosfatos de sódio e os polifosfatos (hexametáfosfatos de sódio e pirofosfato de sódio).

Ácido etilenodiamina tetracético (EDTA)

O ácido etilenodiamina tetracético (Figura 2.6) e seus sais de sódio (Na_2EDTA) e cálcio (CaNa_2EDTA) são muito utilizados como agentes complexantes na indústria de alimentos. Forma complexos estáveis com vários íons metálicos di ou polivalentes, e sua eficiência máxima ocorre em valores de pH elevado, em que os grupos carboxila se encontram dissociados.

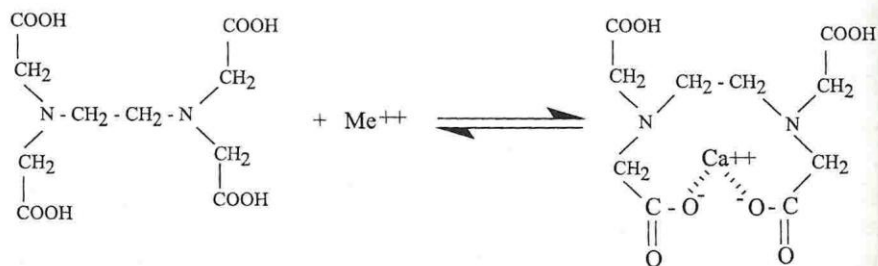


Figura 2.6 - Representação esquemática da formação do complexo Me-EDTA.

Utilização

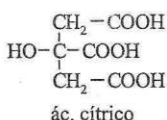
Diversos fatores afetam a complexação, incluindo o pH, temperatura e a presença de outros íons. Do ponto de vista prático, o pH é o parâmetro mais importante a ser considerado. Os íons metálicos

interferentes mais comuns em alimentos são o cobre e ferro, que se complexam eficientemente em pH na faixa de 2 a 12 com ambas as formas de EDTA.

O pH do alimento é importante na formação do complexo com o EDTA. Com a elevação do pH, aumenta a dissociação do EDTA. A complexação do cálcio, por exemplo, é maior em pH acima de 8,5; abaixo de 3,0 não ocorre a formação do complexo, ao passo que com o zinco a complexação ocorre acima de 6,0. Funciona sinergisticamente com o BHA, BHT, GP e ácido ascórbico na estabilização de óleos e gorduras. A adição do EDTA antes do branqueamento previne a descoloração e o aparecimento de *off-flavor* em vegetais enlatados e congelados. A combinação do EDTA com ácido ascórbico e nitrito de sódio acelera o processo de cura.

Ácido cítrico

O ácido cítrico é um constituinte de ocorrência natural em plantas, microorganismos e animais. É utilizado como sinergista para os antioxidantes primários e removedores de oxigênio em níveis de 0,1-0,3%.



Utilização

É muito utilizado como acidificante e complexante na indústria de alimentos, e a maioria das formulações comerciais de antioxidante (Tabela 2.11) contém ácido cítrico. Embora seu poder seqüestrante seja menor que o do EDTA, é efetivo em retardar a degradação oxidativa de lipídios em alimentos e é comumente adicionado em óleos vegetais após a desodorização. Complexa com íons metálicos em óleos e gorduras em níveis de 0,005 - 0,2 %. Em frutas congeladas, o ácido cítrico protege o ácido ascórbico da oxidação catalisada por metais; em combinação com o ácido ascórbico, ele previne a descoloração de frutas e vegetais enlatados. Entretanto, não é tão eficiente como o EDTA e os pirofosfatos. Em mistura com o ácido eritórbico, pode ser utilizado em substituição ao sulfeto no controle do escurecimento em banana, maçã, peixes congelados e vegetais.

Tabela 2.11 - Algumas formulações comerciais de antioxidantes

Eastman Tenox 2	- 20% BHA + 6% GP + 70% Propileno glicol + 4% Ácido cítrico
Eastman Tenox 4	- 20% BHA + 20% BHT + 60% Óleo vegetal
Eastman Tenox 6	- 10% BHA + 10% BHT + 6% GP + 12% Propileno glicol + 6% Ácido cítrico + 28% Óleo vegetal + 20% Glicerol monoleato + 8% Monoleato de sorbitana
Eastman Tenox 7	- 28% BHA + 12% GP + 34% Propileno glicol + 6% Ácido cítrico + 20% Monoleato de glicerol
Eastman Tenox 20	- 20% TBHQ + 70% Propileno glicol + 10% Ácido cítrico
Eastman Tenox 22	- 20% BHA + 6% TBHQ + 70% Propileno glicol + 4% Ácido cítrico
Eastman Tenox 26	- 10% BHA + 10% BHT + 6% TBHQ + 12% Propileno glicol + 6% Ácido cítrico + 28% Óleo vegetal + 28% Monoleato de glicerol
Eastman Tenox S-1	- 20% GP + 70% Propileno glicol + 10% Ácido cítrico
Sustane 3F	- 66,7% BHA + 20% GP + 13,3% Ácido cítrico

Incorporação de Antioxidantes em Alimentos

Devido a diferenças em suas estruturas moleculares, os vários antioxidantes possuem substancial diferença em sua eficiência quando utilizados em variados tipos de óleos ou alimentos e diferentes condições de processamento e manuseio. Além da potência do antioxidante em determinada aplicação, outros fatores devem ser levados em consideração, como facilidade de sua incorporação, característica *carry-through*, sensibilidade ao pH e tendência a provocar descoloração no produto ou de produzir *off-flavor*. Além do mencionado, o problema em selecionar o melhor antioxidante ou combinação é adicionalmente complicado pela dificuldade na predição de como o antioxidante funcionará na presença de pró-oxidante e de outros antioxidantes presentes no alimento ou formados durante o processamento. Formulações contendo diferentes combinações de antioxidantes e sinergistas encontram-se disponíveis no mercado (Tabela 2.11).

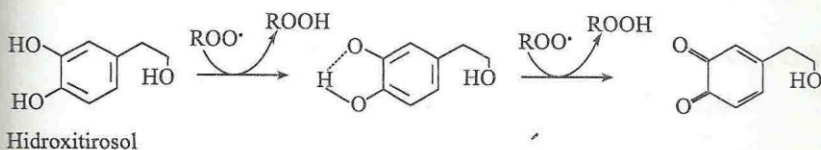
Gordura animal: A grande maioria das gorduras de origem animal é desodorizada para a remoção de compostos voláteis e de ácidos livres. Os antioxidantes fenólicos são voláteis nas condições de desodorização, portanto a sua adição deve ocorrer durante a etapa de resfriamento.

Para a banha de porco, se comercializada no seu estado natural, ou seja, não-desodorizada, recomenda-se a adição da solução do antioxidante à gordura aquecida ($\pm 60^\circ\text{C}$), com agitação.

Óleos vegetais: Todos os óleos vegetais são desodorizados, e a adição da formulação contendo o antioxidante deve ocorrer durante o resfriamento. Quando se utiliza o óleo vegetal em frituras, é importante levar em consideração o aspecto da volatilização e decomposição do antioxidante à temperatura elevada. Por exemplo, durante a fritura da batata ocorre, além da absorção elevada da gordura pelo produto, a volatilização do antioxidante. Conseqüentemente, devem-se compensar essas perdas, adicionando mais óleo em intervalos de tempo.

No caso do azeite de oliva, o teor de compostos fenólicos naturalmente presentes é elevado. O tipo extravirgem, é obtido da primeira prensagem a frio sem adicional refinamento, possui elevada concentração de compostos fenólicos ($\sim 200\text{ mg/kg}$); já o óleo refinado (acidez elevada) contém $\sim 60\text{ mg/kg}$. O principal componente fenólico é o hidroxitirosol ($\sim 14,0\text{ mg/kg}$) e, para o refinado ($\sim 1,6\text{ mg/kg}$), conferindo estabilidade ao produto (eq. 2.4).

eq. 2.4



Os compostos fenólicos atuam como antioxidantes de várias formas. Podem complexar com metais prevenindo a formação de radicais hidroxil, entretanto a atividade mais importante está relacionada com a remoção de radicais livres. As propriedades antioxidantes dos O-difenóis estão associadas com a formação de pontes de hidrogênio intramolecular entre o grupo hidroxila e o radical fenoxil. O número de hidroxilas e sua respectiva posição no anel são importantes. Substituições na posição

orto- e *para-* são mais estáveis que na posição *meta-*. Em particular, *orto*-difênóis (hidroxitirosol) possuem elevada atividade antioxidante, enquanto simples hidroxila (tirosol) não confere nenhuma atividade.

Cereais e produtos desidratados: A incorporação de antioxidantes nesses produtos é mais complicada, em razão da dificuldade de contato do antioxidante com a fase gordurosa. No caso de cereais, o antioxidante é incorporado, em níveis elevados, na parte interna da embalagem. Com a volatilização do antioxidante à temperatura ambiente, ocorre difusão gradual para o produto. Outra forma menos satisfatória, em razão da dificuldade de se obter uma distribuição uniforme, é a aplicação do antioxidante diretamente no produto, na forma de *spray*.

Peixe: O principal problema de instabilidade é de origem microbiológica e não-oxidativa. Além da dificuldade de penetração do antioxidante, o óleo de peixe é altamente insaturado e de difícil controle de auto-oxidação.

Carne: Carnes fatiadas, picadas, moídas e trituradas podem ser estabilizadas pela adição de antioxidante (geralmente BHA + ácido cítrico); dispersado na superfície e com a migração para a fase gordurosa, oferece adequada proteção.

Antioxidantes: Detecção e Quantificação

A - Extração de Antioxidantes

Reagentes

- Etanol 80% e éter de petróleo.

Procedimento

- Pesar 7,5 g de óleo/gordura em béquer de 50 ml.
- Adicionar 15,0 ml de éter de petróleo.
- Transferir a amostra, após sua dispersão, para o funil de separação (100,0 ml); lavar o béquer com éter de petróleo (10,0 ml) e transferir este éter para o funil de separação.
- Adicionar 15,0 ml de etanol 80% no funil de separação.

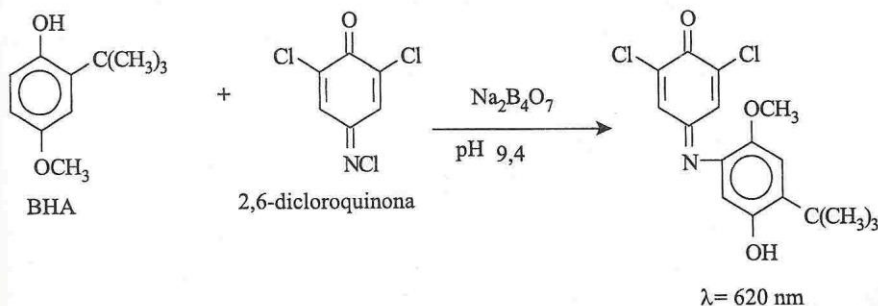
- Fechar e agitar o funil por 3 minutos; deixar em repouso até a separação das fases.
- Remover a fase etanólica para frasco volumétrico de 100,0 ml (filtrar, para remoção de glóbulos de gordura).
- Repetir a extração com etanol 80% (3 vezes), sempre filtrando no frasco volumétrico.
- Descartar a fase contendo éter.
- Lavar o filtro de papel com etanol 80% e ajustar o volume final com ETOH 80%.

B - Cromatografia de Camada Fina – Qualitativa

- Concentrar a amostra e aplicar 10,0 µl na sílica-gel.
- Promover a separação, usando-se a seguinte fase móvel: éter de petróleo : benzeno : acetato de etila : ácido acético (40:40:25:4).
- Preparar e aplicar, simultaneamente, os padrões e identificar os antioxidantes presentes na amostra após a revelação, utilizando-se vapores de iodo ou 1,0% de FeCl_3 (p/v) e 1,0% de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (p/v); após o preparo, misturar as duas soluções ou 2,0% de FeCl_3 (p/v).

C - Método espectrofotométrico: baseia-se na formação do complexo de cor azul (620 nm), resultante da reação do BHA com o reagente de Gibbs (eq. 2.5).

eq. 2.5



Reagentes

A - Solução-Padrão de BHA

- Dissolver 0,1 g de BHA em 100 ml de etanol 100%; esta solução contém 1.000,0 µg BHA/ml.
- Preparar uma solução intermediária, diluindo 5,0 ml da solução-estoque anterior para 50,0 ml com etanol 100%; esta solução contém 100,0 µg BHA/ml.
- Preparar soluções-padrão, diluindo 5,0 ml da solução intermediária em frasco de 50,0 ml; utilizar os seguintes solventes:
 - . etanol 100%: 3,0 ml;
 - . água destilada: 2,0 ml; e
 - . etanol 80%: 40,0 ml.

Obs.: Esta solução contém 10,0 µg de BHA/ml, estável por uma semana em refrigerador.

Procedimento

B - Análise Qualitativa do BHA

- Colocar 5,0 ml do extrato preparado, como descrito anteriormente, em bquer de 50,0 ml.
- Adicionar 2,0 ml do tampão tetraborato de sódio pH 9,4 (2,0 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ em 100,0 ml de água).
- Adicionar 1,0 ml do reagente 2,6-D (100 ml de ETOH 100% + 0,01 g de dicloroquinona-cloroimida) e deixar em repouso/15 min.

Aparecimento de coloração azul indica presença de BHA.

C - Análise Quantitativa do BHA

Preparar seis tubos, como esquematizado a seguir:

Tubo	Padrão (10 µg/ml)	ETOH 80% (ml)	Tampão (ml)	2,6-D (ml)	µg/tubo	%T	A
1	10 ml	0	2	2	100		
2	5 ml	5	2	2	50		
3	3 ml	7	2	2	30		
4	1 ml	9	2	2	10		
5	Amostra (10 ml)	-	2				
6	Amostra (5 ml)	5	2				

Amostra: 7,50 g de óleo.

- Deixar em repouso durante 15 minutos.
- Medir a absorvância a 620 nm (cubetas de 1,0 cm), utilizando etanol 80% como referência.

Obs.: Se os tubos que contêm o extrato estiverem opacos, adicionar 5,0 ml de n-butanol e agitar.

D - Avaliação da Eficiência do Antioxidante

Reagentes

- Betacaroteno e ácido linoléico
- Etanol e clorofórmio
- Ágar e Tween 40

a) Técnica da difusão em placas (visual)

As placas utilizadas para detectar a atividade antioxidante são preparadas da seguinte maneira:

- Adicionar, à solução de ágar (1,5%) aquecido e resfriado a 50 °C, 2,0 ml de solução de ácido linoléico (2 gotas em etanol) e 10 ml de uma solução de betacaroteno (0,5 mg/ml acetona) dissolvido por refluxo.
- Colocar o ágar em placas de Petri e deixar solidificar.
- Perfurar o ágar solidificado com furador de cortiça de capacidade de 0,2 ml.
- Acrescentar o antioxidante (ou antioxidantes) a ser testado e incubar as placas a 45 °C até que a cor de fundo tenha clareado.

b) Determinação espectrofotométrica (quantitativo)

- Preparar uma solução contendo 1,5 mg de betacaroteno em 10 ml de clorofórmio.
- Retirar 0,1 ml dessa solução e diluir em 5,0 ml com clorofórmio.
- Fazer leitura a 470 nm; leitura entre 0,65 e 0,70 indica concentração adequada de betacaroteno.
- Retirar 1,0 ml dessa solução e colocar em frasco de aquecimento contendo três gotas de ácido linoléico e seis gotas de Tween 40.
- Evaporar o clorofórmio em evaporador rotativo a 50 °C e acrescentar 50 ml de água destilada previamente oxigenada (borbulhar oxigênio); os primeiros 10 ml de água devem ser adicionados gota a gota, com agitação vigorosa, para se obter uma emulsão bem clara.
- Preparar o branco contendo três gotas de ácido linoléico, seis gotas de Tween 40 e 50 ml de água destilada oxigenada.
- Retirar 5,0 ml da emulsão e passar para o tubo espectrofotométrico, adicionar 0,1 ml da solução do antioxidante a ser testado e fazer leitura imediatamente a 470 nm.
- Incubar os vários tubos contendo o antioxidante em banho-maria regulado a 50 °C e fazer leitura a cada 30 minutos até o desaparecimento da coloração no tubo-controle.
- Calcular o índice do antioxidante (% da atividade), conforme a equação a seguir:

$$\text{I.A.} = \frac{\text{As} - \text{Ac}}{\text{Ao} - \text{Ac}} \times 100, \text{ sendo}$$

As = absorvância da amostra ao final do teste;

Ac = absorvância do controle ao final do teste; e

Ao = absorvância inicial do controle.

EXERCÍCIOS

1) *Certo/errado*, explicar. Antioxidantes como BHA e BHT utilizados em produtos processados destroem quantidades substanciais de vitaminas, mas são necessários para preservar o óleo/gordura.

CONSEQÜÊNCIAS BIOLÓGICAS DA OXIDAÇÃO DE LIPÍDIOS

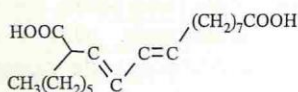
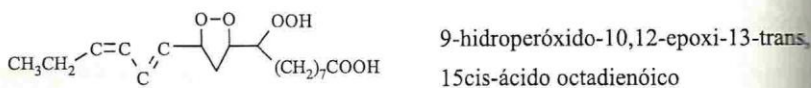
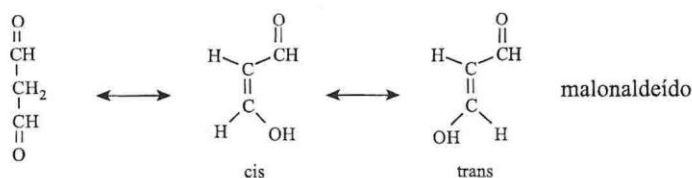
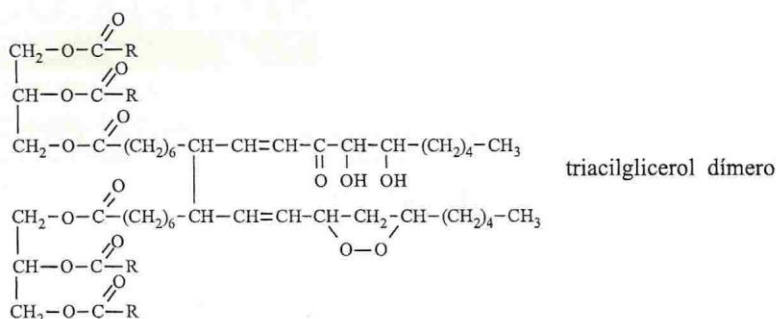
Introdução

A ingestão de óleos/gorduras termicamente alterados representa fonte de substâncias potencialmente tóxicas na dieta, e algumas destas são mostradas na Figura 3.1. Três classes distintas de substâncias de ocorrência em óleos e gorduras oxidados possuem efeito tóxico, as quais são representadas pelos ácidos graxos peroxidados e por seus produtos de decomposição, polímeros e esteróis oxidados formados em condições de processamento e armazenamento.

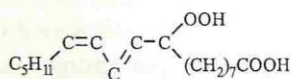
As gorduras saturadas são mais estáveis, mas significantes produtos de origem termolítica e oxidativa podem ser formados. As insaturadas se degradam rapidamente, e as hidrogenadas, em velocidade menor; o colesterol é também oxidado de forma semelhante para diversos derivados oxigenados. Portanto, uma mistura complexa de compostos potencialmente tóxicos pode ser formada a partir dos diversos tipos de óleos/gorduras submetidos ao aquecimento, estando envolvidos no aparecimento de certas doenças, como as cardiovasculares, o câncer e o envelhecimento precoce.

Os produtos oriundos da oxidação de lipídios (peróxidos e os produtos de sua degradação) podem ser absorvidos pelo organismo (Figado) e, até mesmo na ausência de absorção, representam riscos para a mucosa intestinal. Os peróxidos afetam a atividade de diversas enzimas, alteram as proteínas de baixa densidade (LDL) que estão envolvidas no desenvolvimento de lesões arterioscleróticas e interagem com o DNA, funcionando como promotores da carcinogênese. Acredita-se que a

oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) seja a principal causa de doenças cardiovasculares, e a decomposição de peróxidos formados pela ação da lipoxigenase pode ser o mecanismo inicial da oxidação do LDL.



13-hidroperóxido-10-trans, 12-trans-ácido octadienóico (13-ROOH ácido linoléico)



9-hidroperóxido-10-trans, 12-cis-ácido octadienóico (9-ROOH ácido linoléico)

Figura 3.1 - Produtos da oxidação de lipídios.

A peroxidação de ácidos graxos polinsaturados *in vivo* leva à formação de malonaldeído, que pode provocar ligações cruzadas nas lipoproteínas de baixa densidade, causando acúmulo de colesterol no vaso sanguíneo. Os ácidos graxos peroxidados inibem a produção de prostaciclina PG_1 , produzida pelo endotélio vascular, conhecida como potente inibidor da agregação de placas no vaso sanguíneo.

Na célula, a oxidação de lipídios ocorre principalmente nas membranas, devido ao elevado teor de ácidos graxos polinsaturados, com a participação de radicais livres de forma semelhante à descrita no Capítulo 1. Um sistema de defesa antioxidante complexo oferece proteção às células, e sua eficiência depende do consumo adequado de alimentos.

Formação de Radicais Livres no Organismo

Os radicais livres são definidos como “moléculas que possuem elétrons não-pareados em seu orbital externo”. São geralmente instáveis e muito reativos. Os elétrons tendem a ocorrer em pares e em rotação antiparalela, situação esta energeticamente favorável; portanto, quase todas as ligações químicas tendem a ter dois elétrons. O elétron não-pareado é aquele que se encontra solitário no orbital atômico ou molecular. A maioria das moléculas encontradas nos organismos vivos não é radical.

Os radicais livres são formados por perda ou ganho de um elétron a partir de uma espécie não-radical. Os dois elétrons da ligação podem ser rompidos de duas formas: *simetricamente, pela cisão homolítica da ligação covalente* ($R - H \rightarrow R^\cdot + H^\cdot$), e *assimetricamente, pela cisão heterolítica da ligação covalente; neste caso, apenas um átomo recebe os dois elétrons* ($R - H \rightarrow R_2^- + H^+$). Somente as espécies químicas formadas pelo processo homolítico são denominadas radicais livres, em razão da presença de elétrons não-pareados.

Os elétrons são mais estáveis quando presentes na forma pareada, em orbitais; os radicais são mais reativos que os não-radicais, porém sua reatividade depende da espécie química. Os radicais livres podem reagir com outras moléculas de diferentes modos: *interagindo entre si, formando ligações covalentes* $A^\cdot + A^\cdot \rightarrow A - A$; *doando o elétron não-pareado para outra molécula (radical reduzido); aceitando o elétron de*

outra molécula para formar o par (radical oxidado); ou sendo adicionado a outras espécies não-radicais. Entretanto, se o radical doa, recebe ou libera o elétron para o não-radical, esta espécie torna-se um radical livre. Portanto, as reações envolvendo os radicais livres acontecem em cadeia.

Em sistemas biológicos, os radicais livres podem ser formados pela ação da irradiação ionizante e luz ultravioleta e por reações catalisadas pelos metais (ferro e cobre) ou por enzimas (homólise da ligação química). O corpo humano também produz radicais livres durante o seu metabolismo normal, como subprodutos da respiração e da síntese de estruturas mais complexas. São requeridos para diversos processos bioquímicos normais, como na sinalização e no controle do crescimento celular, no ataque de patógenos invasores, na síntese enzimática de moléculas bioativas pelas ciclooxygenases, lipoxigenases e pelo nucleotídeo redutase (formação de deoxirribonucleotídeos a partir de ribonucleotídeos), na detoxificação de substâncias estranhas, como certos aditivos químicos, e de substâncias tóxicas naturalmente presentes nos alimentos e na oxidação do etanol etc.

As espécies reativas oriundas do oxigênio ($^1\text{O}_2$; $\text{O}_2^{\cdot-}$; $\cdot\text{OH}$; $\text{ROO}^{\cdot}$; $\text{RO}^{\cdot}$) e nitrogênio ($\text{NO}^{\cdot}$ e $\text{NO}_2^{\cdot}$) são essenciais para o suprimento de energia, sinalização química de moléculas nas células, detoxificação e função imune, sendo, portanto, continuamente produzidos pelo organismo humano. Em caso de formação excessiva (exposição a oxidantes externos: radiação e poluição) ou funcionamento imperfeito dos mecanismos antioxidantes de defesa, tais espécies podem causar danos ao DNA, lipídios e proteínas, estando associados ao aparecimento de doenças crônicas (vasculares e câncer). Estima-se que de 1-3 % do oxigênio inalado seja utilizado para a produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$, portanto acima de 2,0 kg de superóxido/ano é produzido pelo corpo humano (níveis acima são produzidos por indivíduos com inflamações crônicas).

Alguns antioxidantes são sintetizados pelo organismo humano incluindo enzimas (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase), outras proteínas (GSH, ubiquinol) e espécies de baixo PM (uratos). Evidências comprovam que os antioxidantes endógenos não previnem completamente os danos provocados pelas espécies mencionadas.

Baixos níveis de óxido nítrico ($\text{NO}^{\cdot}$) são continuamente formados *in vivo* em mamíferos (Tabela 3.1). O íon superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) é formado

nos processos enzimáticos e não-enzimáticos no tecido. Sendo altamente reativo, é convertido em água pelas células, envolvendo a redução para peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela superóxido dismutase, seguida da redução da água oxigenada para água pela catalase. A competição pelo superóxido entre o óxido nítrico e a enzima superóxido dismutase aumenta a formação do peroxinitrito no tecido em concentração elevada do superóxido ou do óxido nítrico.

Tratando-se de radicais livres, os quais normalmente possuem pequena vida útil, o óxido nítrico é uma exceção (~3,0 min), o que possibilita sua difusão pelas membranas em busca de alvos biológicos. Para o peroxinitrito atuar como pró-oxidante em tecidos biológicos, é necessária a presença do óxido nítrico e do superóxido. O óxido nítrico pode ser produzido por mecanismos enzimáticos (Tabela 3.1), pela ação da enzima sintase utilizando a L-arginina como substrato ou a redução do nitrito pela redutase. Pelo mecanismo não-enzimático, a formação do óxido nítrico inclui a redução do nitrito em pH ácido ($pH < 4,0$), luz na presença de carotenóides, ou pela ação de fortes agente redutores, como a vitamina C.

Tabela 3.1 - Mecanismo de formação do óxido nítrico em tecidos biológicos

Mecanismo	Reação
1 - Óxido nítrico sintase	$L\text{-arginina} \rightarrow L\text{-citrulina} + NO^\bullet$
2 - Nitrato redutase	$NO_2^- + NADH \rightarrow NAD^+ + NO^\bullet$
3 - Redução não-enzimática do NO_2^-	$NO_2^- \rightarrow NO \text{ (pH } < 4,0)$
	$NO_2^- \rightarrow NO^\bullet \text{ (luz, carotenóides)}$
	$NO_2^- \rightarrow NO^\bullet \text{ (redução do ác. ascórbico)}$

A atividade da enzima óxido nítrico sintase pode ser observada em diversos tecidos biológicos utilizados como alimentos, incluindo carnes, peixes, legumes e germe de trigo. Além da atividade da enzima, o íon superóxido (pode ser produzido após o abate ou a colheita) tem de estar presente para formar o peroxinitrito. Este é um oxidante versátil, capaz de promover a oxidação de diversos componentes celulares, incluindo

ascorbato, glutathione, tocoferol, ácido úrico, ácidos graxos insaturados, aminoácidos livres ou ligados e bases purinas.

O peroxinitrito não é um radical livre, mas é capaz de promover diretamente a formação de peróxidos, os quais se tornam significante fonte de substrato oxidável para outros prooxidantes. Exemplificando, a lipoxigenase necessita ser ativada para se tornar prooxidante, o que ocorre na presença de peróxido. A habilidade da hemoglobina em catalisar a oxidação de lipídios é aumentada na presença de peróxido e o efeito prooxidante dos metais de transição, como o ferro, acelera a decomposição dos peróxidos em radical alcóxil e peróxil.

Todos eles são produzidos nas espécies animal e humana em condições fisiológicas e patológicas. A ingestão de antioxidantes como a glutathione, arginina, citrulina, creatinina, selênio, zinco, vitamina E, vitamina C e polifenóis, associada com a atuação de enzimas antioxidantes endógenas como a superóxido dismutase, catalase, glutathione redutase e glutathione peroxidase, exerce ação sinérgica na remoção de radicais livres.

Os radicais livres participam de importantes funções benéficas no organismo. Por exemplo, os radicais oriundos do oxigênio exercem ações críticas na transcrição e na regulação de genes em células. O NO é uma das moléculas de sinalização bastante difundida, participa no funcionamento de células e órgãos e atua como neurotransmissor e no sistema imune. Portanto, os radicais livres possuem duas funções distintas, atuando como moléculas sinalizadoras e regulatórias em níveis fisiológicos ou sendo altamente danosos como oxidantes em níveis patológicos.

O oxigênio é necessário para a formação de todas as formas de espécies reativas oriundas do oxigênio e do nitrogênio (Figura 3.2). A formação do óxido nítrico (NO) ocorre a partir da L-arginina catalisada pela enzima NO-sintase. Em contraste, o superóxido é formado a partir do oxigênio por diversos mecanismos: oxidação do NADPH, oxidação da xantina e redução pelo citocromo P-450.

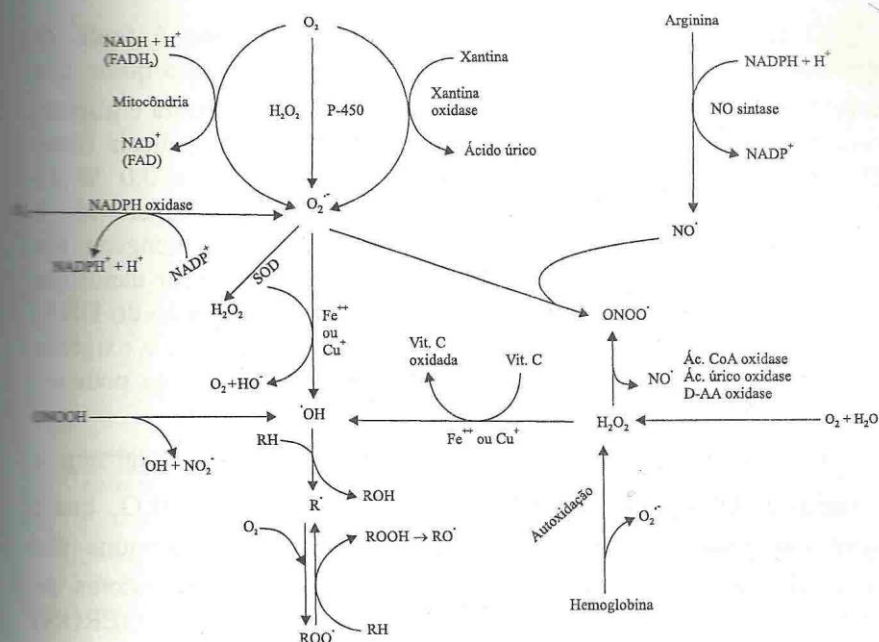


Figura 3.2 - Formação de espécies reativas oriundas do oxigênio e nitrogênio nas células de mamíferos.

A enzima superóxido dismutase converte o íon superóxido ($O_2^{\bullet -}$) para água oxigenada (H_2O_2). O óxido nítrico pode reagir com íon superóxido ou com a água oxigenada formando o peroxinitrito ($ONOO^-$), de potencial oxidante maior que o do íon superóxido ou o da água oxigenada.

Quando os radicais livres ou outras espécies reativas ($^{\bullet}OH$, $HOO^{\bullet}$ e $ONOO^-$) removem átomos de hidrogênio de um ácido graxo insaturado, produz-se o radical livre ($R^{\bullet}$), que interage com o oxigênio formando o radical peroxil ($ROO^{\bullet}$) e propagando a peroxidação pela remoção de outro átomo de hidrogênio de outro ácido graxo insaturado localizado na vizinhança (Capítulo 1). O resultado é a formação do peróxido ($ROOH$), que se decompõe facilmente, formando novo radical alcóxil ($RO^{\bullet}$). A peroxidação de lipídios com a formação de radicais livres (peroxil e alcóxil) ocorre em células, causando danos a seus componentes (proteína, DNA e lipídios).

O sistema mitocondrial de transporte de elétrons é fonte de superóxido. Sendo o NADH, NADPH e FADH_2 produzido quase que exclusivamente via metabolismo aeróbico de proteína, gordura e glicose, o aumento da ingestão de energia eleva a produção de radicais livres pelas mitocôndrias. Em condições fisiológicas, de 1,0 a 3,0 % do oxigênio consumido pelo organismo é convertido em superóxido e espécies reativas oriundas do oxigênio. A exposição prolongada aos radicais livres, mesmo em baixas concentrações, pode causar danos em moléculas biologicamente importantes, resultando na mutação do DNA, injúria nos tecidos e no aparecimento de doenças. Portanto, o oxigênio molecular, embora absolutamente essencial para a vida aeróbica, pode ser tóxico em certas circunstâncias.

O citocromo C e a superóxido dismutase (SOD) catalisam a formação de O_2 a partir do $(\text{O}_2^{\cdot-})$ (Figura 3.3), formando a H_2O_2 , que é convertida posteriormente em H_2O pela catalase. Os peróxidos são convertidos em álcool pela GSH-peroxidase. Outros removedores de espécies reativas oriundas do oxigênio (ERO_2) e do nitrogênio (ERON) incluem o ácido úrico (oriundo do metabolismo das purinas), carotenóides, bilirrubina (produto do catabolismo da hemoglobina), fitatos e polifenóis. Quando a formação de radicais livres é maior que a capacidade de remoção pelo organismo, danos oxidativos podem ocorrer nas células e nos tecidos.

Remoção de Radicais Livres do Organismo

A remoção de radicais livres ocorre por meio de *reações enzimáticas*: superóxido dismutase (SOD), glutathione reduzida (GSH), glutathione peroxidase, glutathione redutase (GSH-R), catalase (grupo heme); e *não-enzimáticas*: antioxidantes: vitamina E, vitamina C, carotenóides (Figura 3.3).

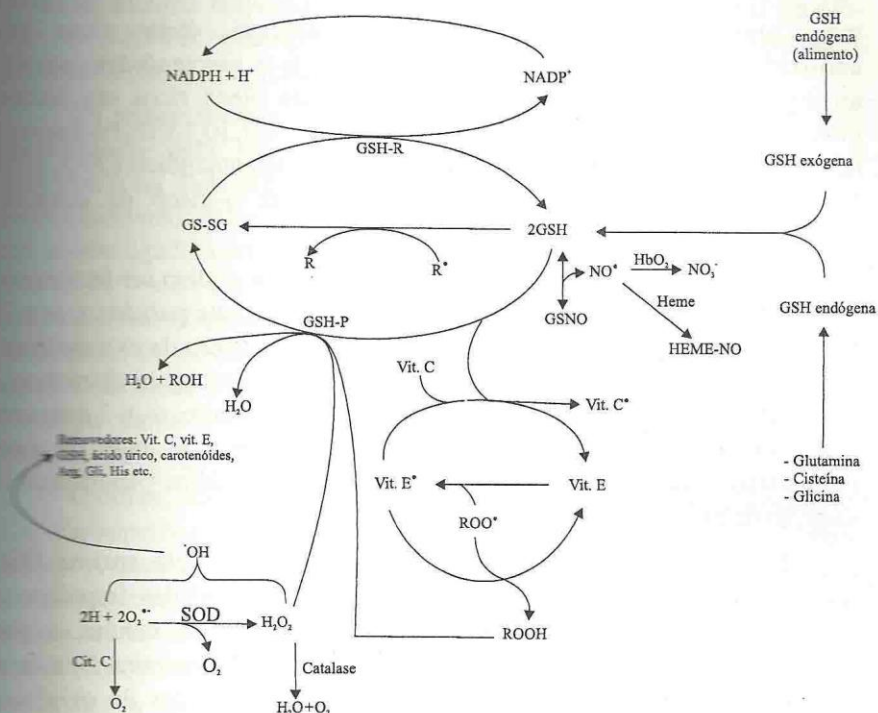


Figura 3.3 - Remoção de espécies reativas oriundas de oxigênio e nitrogênio em células de mamíferos.

O óxido nítrico (NO^*) é removido de três maneiras: pela rápida oxidação causada pela oxi-hemoglobina, formando o nitrato (NO_3^-); pela interação com a glutathiona reduzida (GSH), formando o nitrosotiol; e pela interação com o grupo heme, formando o heme-NO.

Dietas deficientes em proteínas causam, além da síntese inadequada das enzimas antioxidantes, redução da concentração destas nos tecidos, comprometendo a sua atividade. A deficiência de zinco (cofator da Cu, Zn-superóxido dismutase) está também relacionada com a ingestão insuficiente de proteínas, afetando indiretamente a remoção do superóxido pela diminuição na concentração da albumina (transporte de zinco em circulação).

Os ácidos graxos insaturados são sensíveis à oxidação pelos radicais livres, portanto elevada ingestão destes pode tornar o organismo

mais sensível à oxidação lipídica. No entanto, dietas ricas em antioxidantes, como a vitamina C, vitamina E e carotenóides, podem amenizar o efeito da oxidação. O consumo de óleos ricos em ácidos graxos polinsaturados n-3 (peixes), ácido 4,7,10,13,16,19-docosa-hexaenóico (22:6, n-3), ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenóico (20:5, n-3) e α -linolênico (9,12,15-octadecatrienóico) reduz o risco de doenças cardiovasculares.

Como outros polinsaturados, aos ácidos graxos podem ser facilmente oxidados formando peróxido. Para entender este aparente paradoxo, os n-3 inibem não só a formação de radicais livres pelo aumento da expressão de genes antioxidantes (glutathione-S-transferase e Mn-superóxido dismutase), como também a expressão da enzima NO-sintase. Portanto, os n-3 exercem o seu efeito benéfico nas funções cardiovasculares por meio de dois mecanismos: diminuição da concentração de triglicerídios plasmáticos e inibição da produção de radicais livres.

Diversas vitaminas inibem a produção de NO^{*} pela enzima NO-sintase. A vitamina A e a niacina e diversos carotenóides impedem a transcrição de genes da enzima NO-sintase em diferentes células, o que reduz a formação do NO^{*}, prevenindo a sua toxidez. A vitamina E inibe a formação do radical peroxil pelas espécies reativas oriundas do oxigênio, protegendo as células da peroxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas, dos danos oxidativos nas lipoproteínas de baixa densidade, das proteínas celulares, do DNA e, da degeneração das membranas. Consequentemente, dietas deficientes em vitamina E reduzem a atividade da catalase, da GSH peroxidase e da glutathione redutase, induzindo a peroxidação e a desordens neurológicas e cardiovasculares.

A vitamina E transfere o seu hidrogênio fenólico para o radical livre peroxil originado da oxidação de ácidos graxos insaturados (cap. 2), paralisando a reação de propagação e prevenindo adicional oxidação de outros componentes insaturados presentes na membrana celular, como os fosfolípidos. Como agente redutor, a vitamina C interage com a vitamina E radical, regenerando-a. Tal como a vitamina E radical, a vitamina C radical não é reativa em razão de seu elétron não-pareado ser estável energeticamente (Figura 3.3). A vitamina C radical é regenerada pela GSH.

Como componentes do NADP⁺, NAD/NADH e FAD/FADH₂, a nicotinamida e a riboflavina são importantes na proteção oxidativa do organismo. O NADPH e FAD são co-fatores importantes para glutathione

redutase, enzima responsável pela regeneração da GSH a partir da GS-SG. O NADPH está fortemente ligado à catalase, sendo, portanto, necessário para o funcionamento da enzima.

Os minerais como o magnésio são co-fatores de diversas enzimas responsáveis pela produção do NADPH e NADP^+ , portanto a sua deficiência na dieta reduz a atividade da glutatona redutase. O ferro é o mais abundante elemento-traço no organismo, e praticamente quase todo ele ocorre ligado a proteínas. A concentração de ferro livre é muito baixa, pois o Fe^{+++} não é solúvel em água e o Fe^{++} participa da formação de radicais livres (Figura 3.2). Portanto, o aumento da concentração de ferro intracelular ou extracelular, resultante da dieta deficiente em proteínas, do excesso de ferro e da baixa concentração de proteínas que se ligam ao ferro ou danos celulares, promove a produção de espécies reativas oriundas do oxigênio e a oxidação de lipídios.

O cobre, zinco e manganês são metais indispensáveis à atividade da Cu, Zn-superóxido dismutase e Mn-superóxido dismutase, respectivamente. A enzima glutatona peroxidase é dependente de selênio, portanto dieta deficiente diminui a atividade da enzima em 90%. Dietas deficientes desses minerais, além de diminuírem a atividade dessas enzimas nos tecidos, resultam em danos oxidativos e na disfunção da mitocôndria.

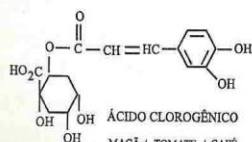
Outros antioxidantes naturalmente presentes nos vegetais, como os compostos fenólicos e polifenólicos, removem os radicais superóxido e hidroxil e inibem as modificações oxidativas das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e aumentam a atividade da enzima Cu, Zn-superóxido dismutase. A biochanina A (Capítulo 14) impede a expressão da enzima NO-sintase.

Os compostos fenólicos são encontrados em grande quantidade e em diversas formas químicas em vegetais, incluindo os *fenóis ácidos*, *flavonóides*, *isoflavonóides*, *tocoferóis* e *tocotrienóis* (Tabela 3.2). Os flavonóides e isoflavonóides (Figura 3.4) são grupos de compostos fenólicos antioxidantes encontrados em alimentos na forma glicosídica, o que os torna menos reativos com os radicais livres e mais solúveis em água. Entre os compostos fenólicos encontrados em grãos e óleos estão os tocoferóis e tocotrienóis, considerados fontes de vitamina E (antioxidante), e os tocotrienóis, conhecidos como inibidores da síntese de colesterol. Os fenóis ácidos (ácido benzóico e cinâmicos e seus derivados tanto na forma livre, esterificados ou ligados), encontrados abundantemente em grãos e oleaginosas, possuem também efeito antioxidante.

Os *compostos fenólicos* contribuem com o sabor adstringente e podem também reduzir a disponibilidade de certos minerais como o zinco (p. 297). Durante o processamento térmico, os compostos fenólicos podem ser oxidados formando quinonas, as quais podem combinar com aminoácidos, tornando-os nutricionalmente indisponível. Tal reação leva a formação indesejável de compostos coloridos no alimento. Portanto, em certas situações é desejável a remoção dos fenóis em alimentos.

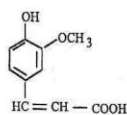
Tabela 3.2 - Teor de polifenóis totais em vegetais e bebidas

Alimento	Polifenóis totais	Alimentos/bebidas	Polifenóis totais
<i>Cereais</i> (mg/100g m.s.)		<i>Frutas frescas (mg/100 p.f.)</i>	
Arroz	8	Maçã	27-298
Cevada	1.200-1.500	Uva	50-490
Milho	31	Laranja	50-100
Sorgo	170-10.260	Pêra	2-25
Trigo	22-40	Morango	38-218
Aveia	8	Tomate	85-130
<i>Vegetais</i> (mg/100g p.f.)		<i>Suco de frutas</i>	
Ervilha	78-230	Maçã	2-16
Cebola	100-2.000	Laranja	370-7100
Repolho	25		
Couve-de-bruxelas	6-15	<i>Bebidas</i>	
Salsa	55-180	Chá (mg/200 ml)	150-210
Aipo	95	Café (mg/150 ml)	200-550
		Vinho branco (mg/ml)	200-300
		Vinho tinto (mg/ml)	1000-4000
		<i>Cerveja (mg/ml)</i>	60-100



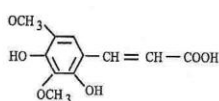
MAÇÃ / TOMATE / CAFÊ
BERINJELA / ABACATE

CENOURA

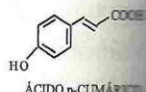


AVEIA / TRIGO / ARROZ

AMENDOIM



AMENDOIM



CITRUS / ABACAXI / MELANCÃO

p.f. (peso fresco), m.s (matéria seca).

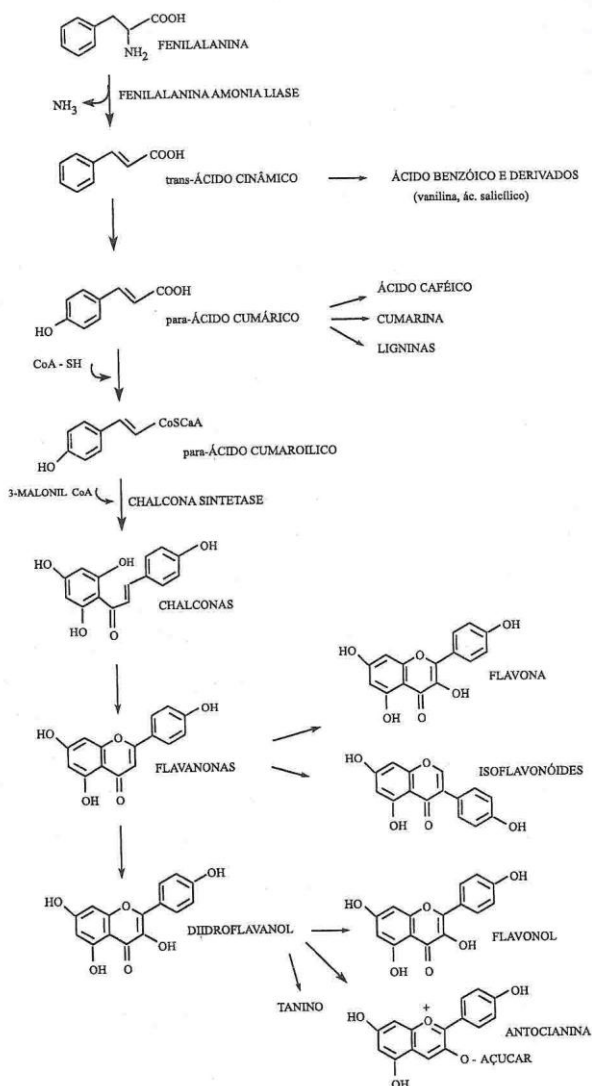


Figura 3.4 - Formação de compostos fenólicos via fenilalanina.

O chá-verde (Tabela 3.3) possui diversos compostos polifenólicos, conhecidos como catequinas (Figura 3.5), incluindo a epigalo-catequina-3 galato (EGCG), epigalo-catequina (EGC) e epicatequina-3 galato (ECG). No chá-preto as catequinas são oxidadas.

Tabela 3.3 - Concentração dos principais compostos fenólicos em chá

	Chá-verde (mg/g)	Chá-preto (mg/g)
Catequina	10-20	5
Epicatequina	10-50	10-20
Epigallocatequina (ECC)	30-100	10-20
Galocatequina		10-30
Epicatequina galato (ECG)	30-100	30-40
Epigallocatequina (EGCG)	70-150	-

As catequinas, bem como o flavonóide miricetina encontrados em vegetais, estão entre os antioxidantes mais potentes encontrados na natureza (Figura 3.5). Os polifenóis representam de 12 a 18% na semente de cacau, sendo 35% destes na forma de epicatequinas. No processamento (fermentação e secagem), as epicatequinas são oxidadas pela polifenol oxidase e se polimerizam ou interagem com as antocianidinas, formando fenóis complexos (taninos), responsáveis pela coloração típica do chocolate e pela diminuição do teor da epicatequina.

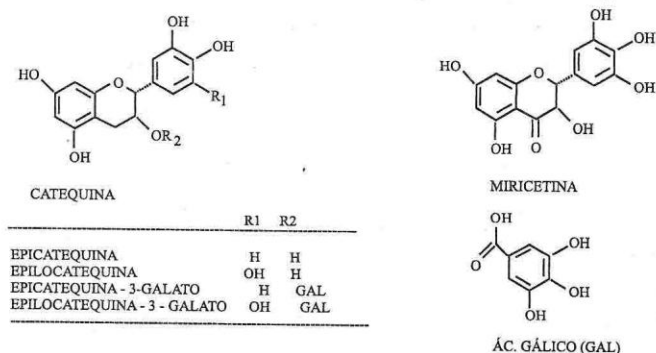


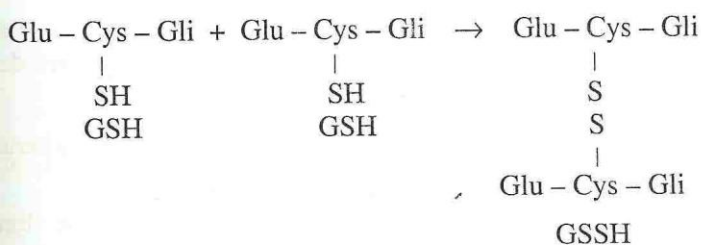
Figura 3.5 - Estrutura química da catequina e miricetina.

Os isoflavonóides encontrados na soja em quantidade elevada também apresentam atividade antioxidante. Na casca da cebola são encontrados níveis acima de 6% de flavonóide, principalmente a quercitina. As batatas são ricas em polifenóis, principalmente, ácido

clorogênico, os quais possuem efeito antioxidante *in vitro*. A casca da batata-vermelha possui quantidades maiores de polifenóis que as outras. A estabilidade do ácido clorogênico depende do tipo de processamento: em batatas assadas, a destruição é total; em cozidas permanece 35% da quantidade original; e em microonda, 55%. Batatas fritas e purê não possuem ácido clorogênico.

A glutathiona (GSH), a mais abundante substância de baixo PM contendo o grupo tiol (-SH) na célula, é sintetizada a partir do *glutamato*, *cisteína* e *glicina* (eq. 3.1). Tem participação importante na biotransformação e eliminação de substâncias estranhas. Diversas reações da GSH envolvem o grupo sulfidril (-SH). A nuvem de elétrons que envolvem o núcleo do átomo de enxofre é altamente polarizada, tornando o grupo sulfidril ótimo agente nucleofílico para reação com compostos eletrofílicos. A sua habilidade de doar elétrons para outros compostos o torna também ótimo redutor. A combinação de sua abundância em organismos aeróbicos, aliados às propriedades químicas do grupo sulfidril, torna a GSH importante molécula na proteção celular contra as espécies reativas oriundas do oxigênio, bem como de compostos eletrofílicos oriundos de processos oxidativos no organismo e do ambiente.

eq. 3.1



Como principal componente do sistema antioxidante celular, a GSH tem as seguintes características: pode ser parcialmente absorvida pelo intestino e sintetizada de novo quando presente na dieta; embora a glutathiona radical (GS[•]) formada pela oxidação da GSH seja prooxidante, esta poderá interagir com outra GS, formando a GS-GS, que é então reduzida para GSH pela NADPH; remove efetivamente as espécies reativas oriundas do oxigênio (radical peroxil, peroxinitrito e água oxigenada) direta e indiretamente, por meio de reações enzimáticas; e

pode ser conjugada com o NO^* , resultando na formação do S-nitroso-glutationa e, posteriormente, hidrolisada, liberando a GSH e NO^* .

O citocromo C e a enzima SOD catalisam a formação do O_2 a partir do $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Figura 3.3), formando a H_2O_2 , a qual é convertida em H_2O pela catalase e GSH peroxidase.

Metabolismo do Oxigênio

O corpo humano produz naturalmente radicais livres e outras espécies reativas oriundas do oxigênio, continuamente. Por exemplo, em torno de 85 a 90% do oxigênio que respiramos é utilizado pela mitocôndria, e o restante, por diversas oxidases e oxigenases, com liberação do radical superóxido e água oxigenada, e por outras reações não-enzimáticas. Quando a sua formação durante o metabolismo celular ocorrer em quantidade suficiente para superar a capacidade de neutralização pelas células, distúrbios celulares e metabólicos ocorrerão de diversas maneiras. Os locais de atuação destes ocorrem ao acaso, nos sítios insaturados das biomoléculas, produzindo modificações químicas indesejáveis em macromoléculas como proteínas, carboidratos, lipídios e nucleotídeos:

- Ligação covalente do radical livre com as enzimas e, ou, receptores localizados na membrana, modificando, as atividades de seus componentes.

- Ligação covalente com os componentes da membrana, alterando a estrutura celular e afetando suas funções.

- Distúrbio no processo de transporte por meio de ligações covalentes, oxidação de grupos tióis (R-SH) ou alteração da relação de ácidos graxos polinsaturados/proteínas.

- Iniciação da oxidação de lipídios insaturados, com efeito direto na estrutura e função da membrana (fluidez e ligações cruzadas).

O resultado destas reações induzidas pelos radicais livres está associado a desordem mental, câncer, envelhecimento precoce e doenças cardiovasculares.

A oxidação de lipídios ocorre principalmente nas biomembranas (Figura 3.6), as quais, além de possuir elevado teor de ácidos graxos

polinsaturados (40% de lipídios (50% de fosfolipídios e 50% de colesterol) e 60% de proteínas), estão presentes na maioria das enzimas envolvidas na ativação do oxigênio. Como resultado, estas enzimas são responsáveis pela iniciação da oxidação, com a formação de espécies reativas do oxigênio, como ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil ($HO^{\cdot}$), peróxido ($ROOH$) e oxigênio singlete (1O_2). O termo reativo é muito relativo, visto que o radical hidroxil é extremamente reativo, enquanto o ânion superóxido, por exemplo, é mais seletivo.

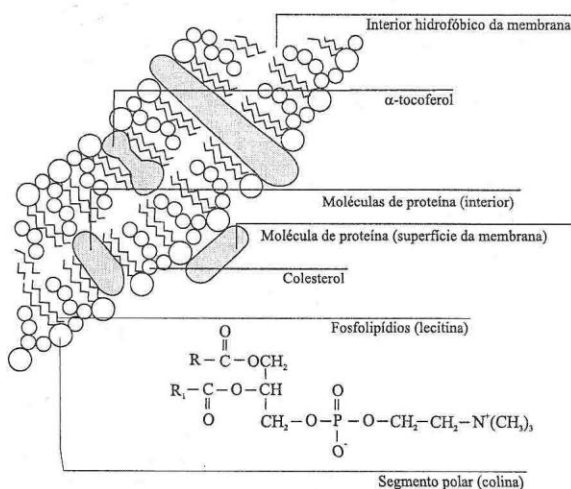


Figura 3.6 - Estrutura da membrana: 40% de lipídios (50% de fosfolipídios e 50% de colesterol) e 60% de proteínas.

A molécula do oxigênio é considerada um radical livre em razão da presença de dois elétrons não-pareados localizados em diferentes orbitais e em rotação paralela (Capítulo 1). Essencial no processo de geração de energia em nível celular, o oxigênio molecular está presente na atmosfera em sua forma mais estável, sendo denominado tripleto (3O_2). Após inalado, é gradualmente reduzido até que se transforme em água pelo envolvimento de quatro elétrons. Durante esse processo, pequenas quantidades de intermediários reativos, como *radical superóxido* ($O_2^{\cdot-}$), *radical hidroxil* ($HO^{\cdot}$) e *peróxido de hidrogênio* (H_2O_2), são formadas (Figura 3.7). O mecanismo de formação de radicais livres a partir do oxigênio pode ser resumido da seguinte forma:

- Redução do oxigênio molecular para água com formação do radical superóxido e do ânion superóxido, sendo o elétron vindo tanto da cadeia respiratória, na mitocôndria, como do citocromo-P-450 do sistema microsomal.

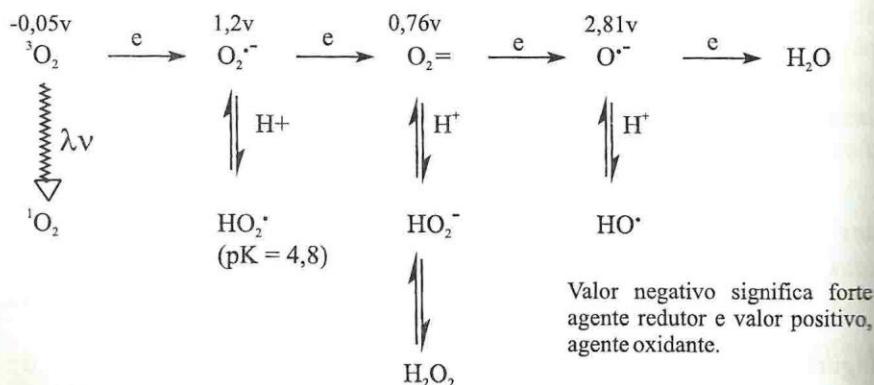
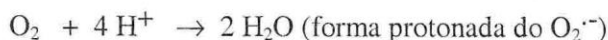
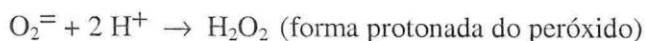
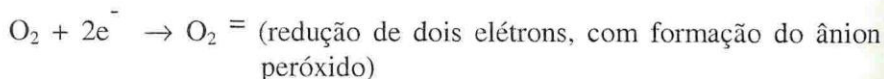
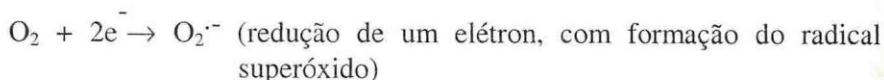


Figura 3.7 - Formação de espécies reativas a partir do oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$).

- Formação do oxigênio singlete, que é outro metabólito reativo do oxigênio, formado pela sua excitação envolvendo a captura de energia ($^1\text{O}_2 + \lambda\nu \rightarrow ^3\text{O}_2$). Embora não seja considerado um radical livre, o oxigênio singlete possui um elétron localizado na periferia de seu orbital, acima da posição normalmente ocupada, que se encontra no estado excitado.

- Metais de transição possuindo elétrons não-pareados. Muitos deles, essenciais na dieta humana, participam estimulando a oxidação de lipídios por dois mecanismos: na geração inicial de radicais livres e na decomposição de peróxidos em radicais peroxil e alcoxil (Capítulo 1).

Um segundo efeito da oxidação de lipídios envolve a participação dos radicais livres em novas reações; portanto, são formados novos compostos, que podem migrar para outras partes da célula ou ser transportados pela corrente sanguínea. Por exemplo, certos tipos de aldeídos formados pela decomposição do peróxido podem se ligar covalentemente aos ácidos nucleicos, induzindo alterações no DNA, e interagir com proteínas e lipídios aminados, alterando suas estruturas.

Recentemente, considerável atenção tem sido dada aos riscos aterogênicos dos radicais livres oriundos do oxigênio. Essas entidades químicas, subprodutos de várias reações bioquímicas no organismo, provocam danos celulares. O mecanismo da aterosclerose ainda não está suficientemente esclarecido, mas estudos têm sugerido que modificações das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) pelos radicais livres são consideradas críticas, pela formação de um LDL oxidado, considerado mais aterogênico que a sua forma nativa. Os antioxidantes com propriedades de remover ou de neutralizar os radicais livres oriundos do oxigênio, como vitamina C, vitamina E, carotenóides e compostos fenólicos, inibem a oxidação do LDL, reduzindo potencialmente os riscos de doenças coronarianas.

Mecanismo de Proteção

A maioria das espécies vivas possui eficiente sistema de proteção capaz de neutralizar os efeitos maléficos ocasionados pelas espécies reativas formadas durante o metabolismo do oxigênio e da oxidação de lipídios (Figura 3.8). Diversas enzimas estão envolvidas nesse mecanismo:

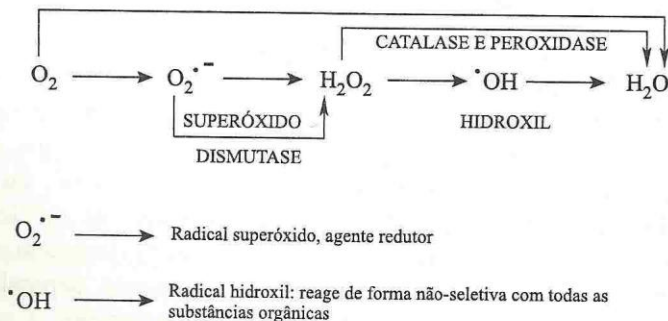


Figura 3.8 - Mecanismo enzimático na prevenção e no acúmulo de intermediários reativos.

Sistema enzimático

A remoção enzimática dos intermediários reativos (Figura 3.9), oriundos da redução do oxigênio pela ação conjunta das enzimas intracelulares, *superóxido dismutase (SOD)*, *glutathiona peroxidase (GSH-Px)* e *catalase*, mantém a concentração destes em níveis aceitáveis, em condições fisiológicas (Quadro 3.1).

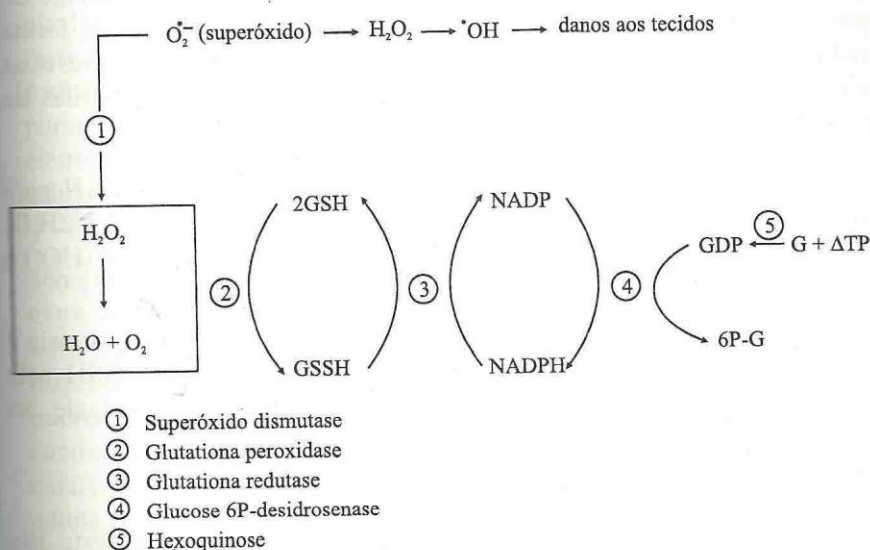


Figura 3.9 - Sistema de enzimas antioxidantes nas células.

Quadro 3.1 - Enzimas com propriedades antioxidantes

<i>Superóxido dismutase:</i>	$2 \text{O}_2^{\bullet -} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
<i>Glutathiona peroxidase:</i>	$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$
	$\text{ROOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$
<i>Catalase:</i>	$\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
<i>Glutathiona transferase:</i>	$\text{ROOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$

Catalase: Destroi o peróxido de hidrogênio, convertendo-o em água e oxigênio. São heme proteínas contendo o ferro no seu centro ativo.

Previne o acúmulo da H_2O_2 dentro das células, catalisando a reação:

$$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$$

GSH peroxidase (GSH-Px): Considerada a mais importante na remoção de peróxido nas células. Esta enzima é constituída de um tripeptídio simples (Glu-Cys-Gli), contendo selênio no seu centro ativo. A água oxigenada e os hidroperóxidos são os substratos para a GSH-Px, que catalisa a redução destes. A atividade da enzima é dependente da presença de quatro átomos de selênio no seu centro ativo. A forma reduzida é abreviada como GSH, e a forma oxidada de GSSG possui duas moléculas de GSH associadas pela oxidação dos grupos sulfidrila da cisteína, formando pontes de enxofre (-S - S-) (eq. 3.1).

A enzima glutathione peroxidase catalisa a oxidação da GSH para GSSG na presença da água oxigenada: $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$, e a forma reduzida da glutathione (GSH) remove o radical hidroxil ($\text{HO}^\bullet$) e o oxigênio singlete.

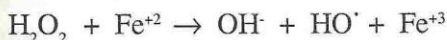
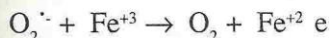
Glutathione reductase: A relação GSH/GSSG em células normais é elevada, e para manter este nível a GSSG é reduzida para GSH pela glutathione reductase; a riboflavina, como co-fator, é importante na regeneração do mecanismo de defesa antioxidante.



O selênio é um micronutriente essencial, e as fontes deste são vegetais como *repolho, aipo e rabanete, grãos integrais, carne e peixe*. É fundamental para a síntese e atividade da glutathione peroxidase, que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de peróxidos orgânicos. O selênio e a vitamina E atuam sinergisticamente no controle da peroxidação *in vivo*. Níveis de ingestão diária para adultos entre 50 e 100 μg são considerados adequados.

Tanto a água oxigenada como o radical superóxido devem ser removidos tão logo sejam formados, em razão do efeito maléfico que podem ocasionar nas células, além do fato de que os cátions divalentes, como ferro e cobre, podem catalisar a interação desses dois metabólitos com a formação adicional do radical hidroxil ($\text{HO}^\bullet$) (eq. 3.2).

eq. 3.2



A formação do radical hidroxil pode também ser originada dos baixos níveis de radiação a que estamos expostos. Este radical é considerado o mais reativo entre todos, removendo hidrogênio, por exemplo, de álcoois e fosfolipídios, pela reação de adição na estrutura de bases aromáticas de purinas e pirimidinas presentes no DNA e RNA e pela transferência de elétrons envolvendo compostos orgânicos e inorgânicos em quase todas as células vivas localizadas próximo da sua formação.

Os radicais livres são eletricamente neutros, mas a espécie denominada *ion superóxido* ($\text{O}_2^{\cdot-}$), formada pela adição de um elétron extra (redução do oxigênio molecular), é eletricamente carregada ($\text{O}_2 + e^- \rightarrow \text{O}_2^{\cdot-}$). O radical superóxido, formado *in vivo* na mitocôndria (cadeia respiratória), é importante no controle de infecções provocadas por microrganismos (fagocitose). A enzima superóxido dismutase (selênio no centro ativo) converte o $\text{O}_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 e funciona em conjunto com a catalase e a glutathione peroxidase, as quais removem a água oxigenada da célula (Figura 3.9).

Os antioxidantes, vitamina E, compostos fenólicos, β -caroteno, ácido ascórbico etc., supridos pela dieta, participam também desse sistema. Atuam bloqueando a ação de radicais livres, formados pela oxidação química e, ou, enzimática – lipoxigenase e ciclooxigenase –, envolvidas na oxigenação de ácidos graxos polinsaturados e, conseqüentemente, na formação de peróxidos.

Superóxido dismutase (SOD): Os efeitos tóxicos e indesejáveis do oxigênio para os organismos aeróbicos são devidos em parte ao aumento na formação da radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), oriundos da oxidação direta de diversas biomoléculas. A enzima superóxido dismutase (SOD) está presente em quase todas as células vivas expostas ao oxigênio, sendo considerada essencial para o mecanismo de defesa. Remove o $\text{O}_2^{\cdot-}$, convertendo-o em água oxigenada.

A enzima superóxido dismutase promove a dismutação do radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), convertendo-o em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o

qual é removido posteriormente pela ação das enzimas catalase e peroxidase, eliminando assim danos a células (eq. 3.3). É encontrada em elevada concentração no citoplasma e em baixa nas membranas, na forma de metaloproteína, contendo cobre, ou ferro, ou manganês no seu centro ativo, e o radical superóxido em meio lipofílico (especialmente nas membranas).

A remoção eficiente das espécies $O_2^{\bullet-}$ e da H_2O_2 é essencial para minimizar a formação do radical hidroxil ($HO^{\bullet}$) nas células. Este é reconhecidamente o mais reativo dentre os radicais livres (remove elétrons de qualquer substância orgânica presente na sua vizinhança). Esta enzima interrompe a reação em cadeia, catalisando a redução do radical $O_2^{\bullet-}$ para H_2O_2 ($2 O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$), e, conseqüentemente, reduz o potencial de formação do radical hidroxil.

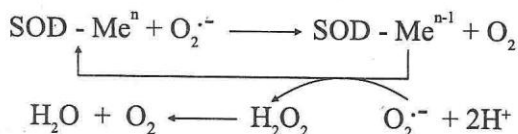
Mecanismo da ação da superóxido dismutase

O mecanismo de dismutação do $O_2^{\bullet-}$ das três formas da enzima superóxido dismutase (SOD) é igual (eq. 3.3). O metal presente no centro ativo participa do ciclo de redução/oxidação da seguinte forma:

- No primeiro estágio, o metal é reduzido pelo $O_2^{\bullet-}$, liberando uma molécula de oxigênio.

- No segundo estágio, outra molécula de $O_2^{\bullet-}$ oxida o metal reduzido no centro ativo, com formação do H_2O_2 .

eq. 3.3



O processo de dismutação é mais rápido em meio ácido ($pH\ 4,8 = pK_a$ do radical peridroxil) e se torna lento com o aumento do pH. A atividade de radical livre do superóxido só se verifica em meio ácido pela formação do radical peridroxil ($HO_2^{\bullet}$), o qual é um agente redutor, e suas propriedades químicas são dependentes do pH. Com base no valor do $pK = 4,8$ e em condições fisiológicas, esta espécie de oxigênio ativado ocorre na forma aniônica com a sua característica de radical reprimida. Nesta situação, atua

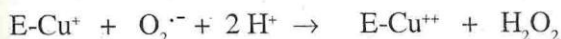
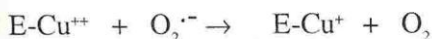
como agente nucleofílico, ou seja, provoca a hidrólise do fosfolipídio da membrana celular, mas não é capaz de iniciar a oxidação de lipídios.

A reatividade do radical peridroxil e do ânio superóxido é controlada pela enzima superóxido dismutase, convertendo o superóxido em peróxido de hidrogênio. Este último pode ter dois caminhos: (1) ser rapidamente decomposto pela ação dos metais de transição, com formação adicional do radical hidroxil; ou (2) a enzima catalase converter o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio.

A formação em excesso das espécies oriundas do oxigênio, principalmente do radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), pode iniciar diretamente o processo de oxidação de lipídios na membrana celular, com a formação de peróxido, além de este radical reagir de forma não-seletiva com os outros constituintes orgânicos das células. A oxidação de ácidos graxos insaturados da membrana celular é o evento oxidativo que ocorre mais frequentemente no organismo.

O cobre presente no centro ativo da enzima atua como carreador de elétrons. Na primeira etapa da reação, o Cu^{++} é reduzido para Cu^+ e o $\text{O}_2^{\cdot-}$ é oxidado para oxigênio molecular. Na segunda etapa, o Cu^+ é oxidado para Cu^{++} e o $\text{O}_2^{\cdot-}$ é simultaneamente reduzido e protonado para peróxido de hidrogênio (eq. 3.4):

eq. 3.4



Formação de oxigênio radical

O oxigênio molecular ou triplete possui dois elétrons não-pareados, sendo cada um localizado em orbitais diferentes (Figura 1.5). Esses dois elétrons possuem *spin* paralelos e, para oxidar outro átomo ou molécula aceitando o novo par de elétrons, ambos têm de estar em *spin* antiparalelo, de forma a preencher o espaço livre no orbital. Esta situação impõe restrição na oxidação, a qual tende a aceitar elétrons pelo oxigênio um de cada vez, permitindo tempo para que ocorra a inversão do *spin* entre as colisões. Isto faz com que o oxigênio seja pouco reativo com as espécies não-radicaís, tornando possível a existência de diversas substâncias orgânicas em meio aeróbico.

Os metais de transição são encontrados no centro ativo de diversas enzimas oxidases e oxigenases, incluindo a superóxido dismutase. A habilidade desta enzima em aceitar e doar elétrons remove a restrição do *spin*.

Reatividade do íon superóxido

Em solução aquosa, o íon superóxido é um redutor de potência moderada e, em comparação com outros produtos reduzidos do oxigênio molecular (H_2O_2 e $\cdot\text{OH}$), é considerado oxidante fraco. A sua participação verificam-se em redução envolvendo um elétron, oxidando fortes agentes redutores como o ácido ascórbico e α -tocoferol.

Durante o armazenamento de alimentos (vegetal e animal), o mecanismo de controle das reações envolvendo enzimas é gradualmente perdido e, nesta condição, espécies químicas reativas são liberadas ou se acumulam no meio, portanto os danos causados pelos radicais livres podem ser extensivos (Quadro 3.2).

Quadro 3.2 - Exemplos de alterações provocadas pelo $\text{O}_2^{\cdot-}$ e espécies radicais oriundas do oxigênio

-
1. Indução a oxidação de lipídios
 2. Despolimerização de polissacarídios
 3. Inativação de vírus e morte de bactérias
 4. Hidroxilação de compostos aromáticos
 5. Branqueamento de pigmentos
-

O íon superóxido contribui com a toxicidade do oxigênio em meio aquoso tanto em células vivas quanto em alimentos, atuando como precursor de mais espécies reativas, isto é, forma reduzida do íon superóxido ($\cdot\text{OH}$). Assim, a formação do radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) pode ser prevenida pela SOD. As equações 3.5 e 3.6 descrevem o possível mecanismo para a produção de radicais hidroxil na presença de $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e íons metálicos livres de transição. Acredita-se que o maior dano biológico do íon superóxido não seja devido à sua reatividade, mas à sua participação na cooperação para a produção do $\cdot\text{OH}$ na presença de íons metálicos de transição.

Tanto em alimentos como nas células vivas, os metais de transição mais abundantes são o ferro e cobre. A contaminação dos alimentos por esses metais acelera a sua deterioração, catalisando a reação entre o $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 produzindo mais radicais livres.

eq. 3.5

$O_2^{\cdot-} + Me^{n+} \rightarrow O_2 + Me^{(n-1)+}$: superóxido atuando como redutor do metal

eq. 3.6

$Me^{(n-1)+} + H_2O_2 \rightarrow Me^{n+} + \cdot OH + HO^{\cdot}$

$O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + \cdot OH + HO^{\cdot}$: reação catalisada por metais

As enzimas catalase, GSH, glutathione peroxidase, glutathione reductase e SOD enzimas são encontradas na fase aquosa da célula. Como ocorre a proteção da fração lipídica da membrana? As membranas celulares consistem de uma camada dupla (Figura 3.6), contendo lipídios altamente insaturados, e sua oxidação provoca danos aos seus constituintes, além do esgotamento dos antioxidantes. O radical livre produzido no interior hidrofóbico da membrana combina com o oxigênio que lá se encontra dissolvido, formando o radical peroxil (O_2 é mais solúvel em solventes orgânicos que na água). O radical resultante ataca as proteínas e oxida novamente os ácidos graxos polinsaturados adjacentes. Os hidroperóxidos formados pela oxidação, por serem mais hidrofílicos, migram para a superfície da membrana para interagir com a água, provocando sua ruptura e alterando a sua fluidez. A proteção da membrana é conseguida pelos seguintes mecanismos:

Remoção de radicais: Nas membranas, o principal removedor de radicais é o α -tocoferol. As outras formas são menos importantes, por serem menos eficientemente absorvidas. Os tocoferóis removem os radicais peroxil antes que estes venham a oxidar os ácidos graxos adjacentes ou as proteínas. O grupo hidroxila presente no tocoferol doa seu átomo de hidrogênio para o radical peroxil, convertendo-o em peróxido. Nessa participação, o oxigênio da hidroxila passa a ter o elétron não-pareado, resultando no tocoferol radical, sendo regenerado pela vitamina C. Sendo o ácido ascórbico solúvel em água, este mecanismo pressupõe que o

radical tocoferol se mova através da membrana até a superfície, para ser então reduzido pelo ácido ascórbico. Dessa interação ocorre a formação do radical ascorbato muito pouco reativo, e dois desses radicais podem-se interagir, ou outra fonte de redutor, como o NADH, regenerar o ascorbato (Figura 3.11).

Sistema de reparo e reposição do lipídio: A ação dos antioxidantes converte o radical peroxil formado na membrana em peróxido. O passo seguinte é a sua remoção pela ação de fosfolipases e a reposição de um novo ácido graxo. O peróxido então liberado é metabolizado pela glutathione peroxidase, reduzindo-o a álcool.

Antioxidantes

Como suporte secundário do mecanismo enzimático descrito, a ingestão de substância com propriedades antioxidantes derivadas da dieta auxilia o mecanismo de defesa no controle dos danos causados nas células pelos radicais livres. A diversidade de antioxidantes de ocorrência natural em vegetais participa do sistema biológico, como agentes de defesa antioxidativa; portanto, o consumo regular destes recompõe o mecanismo de defesa endógeno dos antioxidantes, regulando as várias reações de oxidação-redução perdidas com o decorrer do tempo.

Outros fatores, como a interação entre os vários antioxidantes com a habilidade de regenerar outras espécies oxidadas (vitamina E, vitamina C e glutathione), além de sua possível atuação regulando a expressão de genes, são, talvez, mais importantes que o nível destes no organismo. As células vivas e alimentos *in natura* são protegidos da ação do $O_2^{\cdot-}$ e da H_2O_2 por diversos mecanismos, que os inibem ou removem: SOD, catalase, peroxidase, ascorbato, glutathione, α -tocoferol e β -caroteno.

Os antioxidantes considerados nutrientes são as vitaminas C (frutas e vegetais), e (germe de trigo, óleos vegetais e amêndoas), e os não-nutrientes incluem os flavonóides (chá, vinho tinto, cebola, maçã), polifenóis e terpenos. Os antioxidantes previnem a ocorrência de danos oxidativos em macromoléculas biológicas, provocada pelas espécies reativas oriundas do oxigênio. Tais alterações oxidativas podem significar o desenvolvimento de várias doenças.

A hipótese antioxidante parece indicar que os agentes redutores têm a capacidade de prevenir as alterações oxidativas e, portanto, níveis elevados reduzem o risco do aparecimento das doenças crônicas. As dietas contendo substâncias que atuam como antioxidantes (frutas, vegetais, cereais, óleo e grãos) são provavelmente benéficas para o mecanismo de defesa celular, protegendo os componentes da célula das alterações oxidativas. De modo geral, estas substâncias não tornarão saudáveis as células ou tecidos doentes, entretanto inibirão ou tornarão o progresso dessas mais lentas.

Os antioxidantes solúveis na fração lipídica como a vitamina E e β -caroteno podem prevenir a formação do peroxinitrito, e os hidrossolúveis como ácido ascórbico, glutatona e ácido úrico atuam também diretamente sobre o peroxinitrito, dentre os quais a glutatona reage dez vezes mais rápido que os demais em pH neutro.

Tocoferóis

A vitamina E é um termo coletivo que engloba oito diferentes produtos sintetizados pelos vegetais, os quais podem ser divididos em duas classes: os tocoferóis, que possuem cadeia lateral saturada; e outros, que possuem cadeia lateral insaturada. Desses oito compostos, somente quatro são requeridos nutricionalmente: *alfa*, *beta*, *gama* e *sigmatocopherol*.

São eficientes receptores do oxigênio singlete, sendo o *alfa*-tocopherol o mais reativo dentre os quatro tipos de tocoferóis, combinando processos físico e químico (Figura 3.10). Sua reatividade pelo oxigênio singlete está relacionada com a atividade da vitamina E: *alfa* (100%), *beta* (50%), *gama* (26%) e *sigma* (10%). Sua atividade biológica está relacionada com a habilidade de inibir a oxidação de ácidos graxos insaturados, interrompendo a reação em cadeia na membrana.

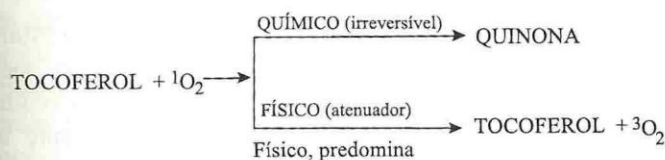


Figura 3.10 - Efeito da vitamina E sobre o oxigênio singlete.

O átomo de hidrogênio do grupo hidroxila localizado no anel aromático (Figura 3.10) é facilmente removível. Portanto, reage diretamente com os radicais peroxil e alcóxil, doando o átomo de hidrogênio e anulando as reações subseqüentes. Atua interrompendo as reações em cadeia na membrana.

Diferentemente do caroteno, os tocoferóis não envolvem um processo de transferência de energia, atuando de duas maneiras:

- *Física:* interação direta do núcleo aromático com o 1O_2 .
- *Química:* interação com o 1O_2 , formando a quinona.

Vitamina C

As funções fisiológicas do ácido ascórbico estão relacionadas com a sua habilidade em doar elétrons. Ela reage rapidamente com os radicais superóxido, peroxil e hidroxil e participa da manutenção do balanço entre os produtos oxidados e o mecanismo de defesa celular dos vários antioxidantes (Figura 3.11).

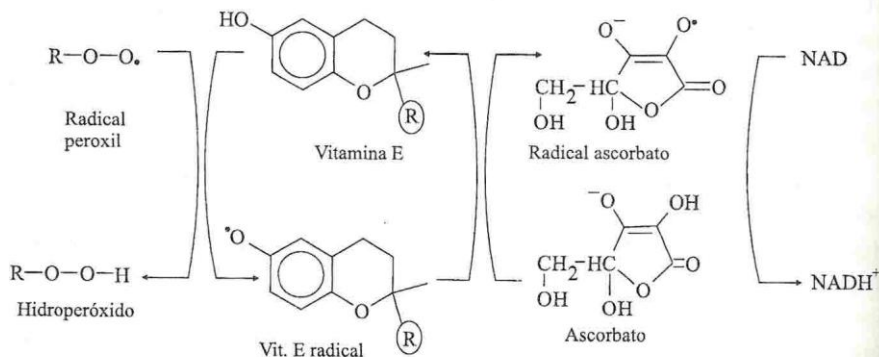


Figura 3.11 - Regeneração da vitamina E pela reação com o radical peroxil.

Em sistema biológico, atua sinergisticamente com a vitamina E, removendo os radicais livres, formados especialmente na membrana celular (Figura 3.11). O radical peroxil formado durante a oxidação do lipídio remove o átomo de hidrogênio da hidroxila presente no alfa-tocoferol, convertendo-o em radical. Este migra para a superfície da membrana, onde é convertido novamente em alfatocoferol pela ação da vitamina C.

Caroteno

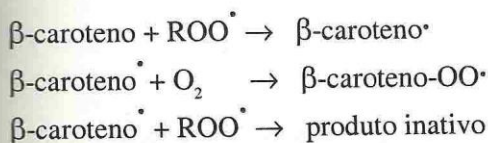
Insolúvel em água e solúvel em óleos e gorduras. Ocorre complexado com proteínas ou ácido graxo nos tecidos vegetais, os quais oferecem proteção contra sua oxidação. O β -caroteno atua como antioxidante na remoção de radicais livres, prevenindo a formação de peróxidos, e como atenuador de oxigênio singlete. A sua atividade antioxidante é limitada em condições de baixa pressão de oxigênio, menos de 150 mm Hg; acima disso, funciona como prooxidante. Em concentrações normais de oxigênio, não atua como antioxidante, portanto complementa a ação de outras moléculas antioxidantes, como catalase, glutatona peroxidase, vitaminas C e E, as quais são efetivas em concentrações normais de oxigênio. Em razão da presença de estrutura conjugada (insaturação), o β -caroteno é sensível à oxidação quando exposto ao ar. É também sensível à luz, temperatura e acidez.

Funções antioxidantes

- removedor de radicais livres; e
- atenuador físico do oxigênio singlete.

A atuação antioxidante do β -caroteno se verifica pela remoção de radicais livres, paralisando, conseqüentemente, a reação em cadeia (eq. 3.7).

eq. 3.7



Atenuador: Os carotenos são moléculas polienes conjugadas, longas e flexíveis que absorvem e dissipam o excesso de energia de espécies químicas altamente reativas, por meio de interações rotacional e vibracional com moléculas adjacentes. O oxigênio singlete é altamente energético e instável. Os carotenóides contendo 9, 10 e 11 insaturações conjugadas são mais eficientes que todos aqueles com oito ou menos insaturações conjugadas. Portanto, os carotenóides com nove ou mais insaturações conjugadas absorvem a energia do oxigênio singlete, distribuindo-a na molécula. O carotenóide energizado resultante libera a energia na forma de calor, restabelecendo a sua energia em nível normal;

dessa forma, por não ser consumido, é reutilizado no processo. Por exemplo, estima-se que uma molécula de β -caroteno possa atenuar 1.000 moléculas de oxigênio singlete.

O betacaroteno é considerado potente antioxidante natural; solúvel em óleos e, ou, gorduras, que protege da oxidação depósitos de gordura e os lipídios da membrana. Atua eficientemente como atenuador físico, dissipando a energia extra contida no oxigênio singlete (Figura 3.12), tido como forte agente mutagênico, em razão da peroxidação de lipídios.

Os lipídios insaturados são um dos principais constituintes da membrana celular. Moléculas altamente reativas, como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), produzem radicais livres no decorrer da reação com moléculas adjacentes. Os radicais livres formados reagem rapidamente com lipídios insaturados presentes na membrana celular, ocasionando lesões ou até mesmo a sua destruição. O material cromossômico presente no núcleo da célula pode ser também afetado, tendo como resultado o desenvolvimento de células cancerosas.

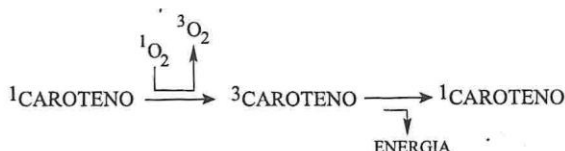
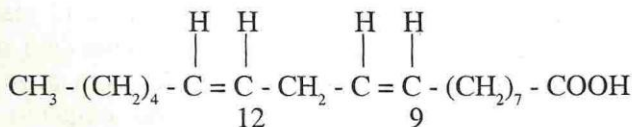


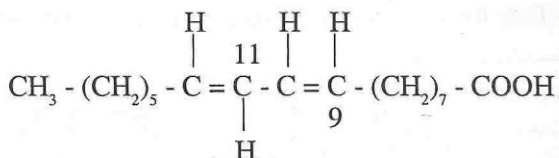
Figura 3.12 - Efeito atenuador do caroteno.

Ácido Linoléico Conjugado (ALC)

Ácido linoléico conjugado é o nome utilizado para descrever um grupo de isômeros do ácido octadecadienóico (18:2). As duplas ligações no ALC são conjugadas e não separadas por grupos metileno ($-\text{CH}_2-$), como no ácido linoléico (18:2n-6), formando sistema conjugado (ou seja, 9,11-, 10,12- e 11,13-ácidos octadecadienóicos, como mostrado a seguir:



ácido linoléico



ácido linolêico conjugado

Estes isômeros ocorrem naturalmente em diversos alimentos em baixos níveis, os quais, porém, elevados (~ 0,5% da gordura total) em carnes e leite de ruminantes (boi, carneiro), em razão do processo de hidrogenação no rúmen do ácido linolêico. A gordura do leite possui ~0,6% de ALC. Entre todos os alimentos, carnes, leite e derivados (queijo, manteiga e iogurte) são as fontes principais de ALC, encontrados em níveis de mg/g gordura. O teor de ALC em carnes de carneiro e boi varia de 1,2 a 5,6 mg/g de gordura; e valores mais elevados (0,5 a 12 mg/g de gordura) podem ser encontrados em derivados do leite (Tabela 3.4). Na maioria das vezes, o isômero do ALC mais comum em carnes e derivados do leite é o octadeca-c9, t11-ácido dienólico, exceto em óleos vegetais os quais possuem diversos tipos.

Evidências científicas sugerem que estes isômeros possuem atividades bioquímicas e fisiológicas na proteção de doenças crônicas. Estima-se que uma pessoa de 70 kg deve consumir 3,0g ALC/dia para se obter os efeitos benéficos. Propriedades anticarcinogênica e antioxidante têm sido demonstradas em experimentação animal. Esses ácidos graxos compreendem uma série de oito ácidos linolêicos isômeros (9c, 11t; 9t, 11c- 10c, 12t-; 10t, 12c-; 11c, 13c-; 9c, 11c-; 10c, 12c-; 9t,11t; 10t,12t- ácidos octadecadienólicos), possuem ligações duplas conjugadas e são coletivamente denominados ácidos linolêicos conjugados. Dos vários isômeros, o 9c, 11t-18:2 é considerado o mais ativo biologicamente, em razão de ser o isômero preferencialmente incorporado nos fosfolipídios da membrana (Figura 3.6).

O ALC ocorre em alimentos como resultados da ação de certas enzimas de origem microbiológica presentes no rúmen, da oxidação catalisada por radicais livres e do tratamento térmico. É encontrado em concentrações elevadas em produtos de origem animal, como carne, queijo e derivados, e, em menor quantidade, em óleos vegetais. Alimentos de origem animal (ruminante) possuem mais ALC que os produtos originados de animais não-ruminantes. Os derivados do leite, especialmente queijos, são as principais fontes de ALC.

Tabela 3.4 - Teor de ácido linoléico conjugado em alimentos

Produto	ALC	%	
	(mg/g gordura)	Isômero (c9, t11-18:2)	
Leite de vaca	0,7-10,0	diversos	59-100
Leite de cabra	6,1-10,30	diversos	99-100
Leite humano	1,7-36,5	diversos	83-100
Queijos*	0,5-24,0	diversos	15-100
Manteiga	4,7-8,2	c9, t11	78-90
Iogurte	1,7-9,0	c9, t11	71-100
Sorvete	3,6-5,0	c9, t11	76-80
Carne de boi (crua)	1,2-8,5	diversos	21-61
Carne de boi (cozida)	3,3-10,0	diversos	19-84
Carne de carneiro	5,6	c9, t11	92
Carne de porco	0,6	c9, t11	82
Carne de frango	0,9	c9, t11	84
Carne de peru	2,5	c9, t11	76
Óleo vegetal	0,1-0,7	Diversos	38-47
Gema de ovo	0-0,6	c9, t11	82
Peixes	0,3-0,6	-	-
Óleo vegetal hidrogenado**	0,9-98,3	diversos	

* Diversos tipos.

** Aumenta com o tempo de hidrogenação.

O mecanismo de ação está relacionado com sua atividade antioxidante. Diferentemente dos outros tipos, são incorporados diretamente nos fosfolipídios da membrana, oferecendo adicional mecanismo de defesa contra os radicais livres (Figura 3.6). Esta propriedade pode também explicar a sua ação anticarcinogênica. Adicionalmente, ALC reduz colesterol e altera a relação LDL/HDL em animais experimentais. Não se sabe ainda se a quantidade do ALC encontrada em certos tipos de alimentos processados possui efeitos biológicos significativos.

Auto-Oxidação do Colesterol

O colesterol é uma molécula planar, insolúvel em água, presente nas membranas entre a porção de hidrocarbonetos dos fosfolipídios; e sua presença afeta a mobilidade da membrana. É sintetizado no fígado e excretado na circulação como componente das lipoproteínas de baixa densidade. Os lipídios que circulam na corrente sanguínea (triacilglicerol e fosfolipídios) e o colesterol livre ou esterificado estão associados a proteínas na forma de macromoléculas complexas que fazem o transporte dos lipídios dos locais de absorção ou de degradação para os locais de utilização e eliminação.

Os lipídios, insolúveis na fase aquosa, para serem absorvidos devem ser transportados pelo sangue, um meio aquoso, portanto há necessidade de uma proteção destas moléculas para se efetuar este transporte. Essa proteção é feita por uma estrutura formada por uma monocamada de moléculas anfipáticas, ou seja, hidrofóbicas e hidrofílicas, chamadas de lipoproteínas. As monocamadas das lipoproteínas são formadas por fosfolipídios, colesterol livre e proteínas e envolvem as moléculas hidrofóbicas: os triacilgliceróis e o éster de colesterol, que formam o recheio da lipoproteína.

O primeiro passo nos efeitos de algumas substâncias biologicamente ativas é a ligação desta a uma proteína receptora no exterior da célula. Os receptores são, com frequência, proteínas oligoméricas. Importante tipo de receptor é o da lipoproteína de baixa densidade (LDL), a principal transportadora do colesterol na corrente sanguínea. A LDL é uma partícula composta de vários lipídios (colesterol e fosfolipídios) e de uma proteína. A porção protéica do LDL liga-se ao seu receptor em determinada célula. O complexo formado entre o LDL e o receptor é internalizado pela célula, pelo processo denominado endocitose. O receptor é, então, reciclado de volta à membrana da célula.

A porção do colesterol da LDL é usada dentro da célula; contudo, um suprimento exagerado de colesterol causa problemas, inibindo a síntese do receptor de LDL. Se houver poucos receptores de LDL, o nível de colesterol na corrente sanguínea irá elevar-se. Finalmente, o excesso de colesterol é depositado nas artérias, bloqueando-as gravemente. Tal bloqueio, conhecido como aterosclerose, pode levar ao ataque cardíaco e a acidentes vasculares.

O colesterol deve ser *empacotado* (o colesterol é apolar e não pode dissolver-se no sangue, que é um meio aquoso) para o transporte na circulação sanguínea, e várias classes de lipoproteínas (Tabela 3.5) estão envolvidas no transporte de lipídios no sangue. Esses agregados de lipoproteínas normalmente são classificados por suas densidades. Além dos quilomícrons, os agregados incluem lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL).

A porção protéica desses agregados pode variar amplamente. Os principais lipídios em geral são os ésteres de colesterol, nos quais o grupo hidroxila está esterificado ao ácido graxo. Os quilomícrons estão envolvidos no transporte de lipídios vindo dos alimentos, ao passo que as outras lipoproteínas transportam principalmente os lipídios endógenos.

As partículas de LDL são captadas pela célula por meio de um processo altamente regulado de endocitose, no qual uma porção da membrana celular contendo a partícula de LDL ligada a seu receptor é levada para o interior da célula. O receptor retorna a superfície da célula, ao passo que as partículas de LDL são degradadas nos lisossomos (organelas que contêm enzimas degradativas). A porção protéica do LDL é hidrolisada para os aminoácidos constituintes, ao passo que os ésteres de colesterol são hidrolisados para colesterol e ácidos graxos. O colesterol livre pode ser utilizado diretamente como componente das membranas; os ácidos graxos podem ter destino catabólico ou anabólico. O colesterol não utilizado para a síntese de membranas pode ser armazenado como ésteres de oleato ou palmitoleato, nos quais o ácido graxo é esterificado para hidroxila do colesterol.

Um terceiro efeito da presença de colesterol livre na célula é a inibição da síntese de receptores de LDL. Como resultado da redução no número de receptores, a síntese intracelular de colesterol é inibida e o nível de LDL no sangue aumenta, levando à deposição de placas ateroscleróticas. Diferentemente do LDL, que transporta colesterol do fígado para o resto do corpo, o HDL (bom colesterol) transporta o colesterol até o fígado, onde será degradado para ácidos biliares. É desejável ter baixos níveis de colesterol e LDL na circulação sanguínea, mas também é desejável ter uma proporção tão alta quanto possível do colesterol total na forma de HDL.

O colesterol é uma molécula hidrofóbica, ou seja, não pode ser transportado pelo sangue (não dissolve no sangue, que é um meio aquoso); por isso, a natureza criou moléculas orgânicas denominadas de lipoproteínas, que são híbridas, contendo porções polar (proteínas) e não-polar (gorduras), as quais *empacotam* o colesterol para o transporte na circulação sanguínea. Várias classes de lipoproteínas (Tabela 3.5) estão envolvidas no transporte de lipídios no sangue.

As lipoproteínas são divididas em dois grandes tipos: *de transporte e de membrana*. As lipoproteínas do plasma ocorrem em quatro principais classes, que diferem entre si pela densidade e pelo tamanho das partículas. Têm a função de transportar, via corrente sanguínea, os lipídios para os vários órgãos, na forma de pequenas partículas de diâmetro e peso constante.

As partículas de quilomícrons são as maiores e menos densas, enquanto as do HDL são menores e mais densas. O aumento na densidade das lipoproteínas está associado com a diminuição correspondente no teor de lipídios e o aumento no teor de proteína. O VLDL possui a mais elevada quantidade de colesterol, e o HDL, de fosfolipídios.

Tabela 3.5 - Principais classes de lipoproteínas do plasma

	Quilomícrons	VLDL	LDL	HDL
Densidade (g/ml)	< 0,94	0,94 - 1,006	1,006 - 1,063	1,063 - 1,210
Tamanho partícula (nm)	75 - 1.000	30 - 50	20 - 22	7,5 - 10
Proteína (%)	5	10	20	45 - 55
Triglicerídio (%)	65	55 - 65	12	3
Fosfolipídio (%)	10	15 - 20	22	24
Colesterol livre (%)	5	5	10	3
Colesterol esterificado (%)	15	15	37	20

VLDL - lipoproteína de densidade muito baixa; LDL - lipoproteína de baixa densidade;

HDL - lipoproteína de alta densidade.

Os *quilomícrons* transportam os lipídios absorvidos do intestino para os tecidos; as *lipoproteínas de densidade muito baixa* (VLDLs) transportam os lipídios produzidos no fígado, ou seja, a partir de açúcar e álcool, para o tecido adiposo; as *lipoproteínas de baixa densidade* (LDLs) transportam o colesterol sintetizado no fígado para os tecidos; e as

lipoproteínas de alta densidade (HDLs) realizam o transporte do colesterol dos tecidos para o fígado.

O colesterol é sintetizado no fígado a partir do acetato (Figura 3.13), por meio de uma série de reações: *acetoacetil-CoA* reage com *acetil-CoA* formando β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (*HMG-CoA*). Este é reduzido para *ácido mevalônico* e convertido via fosforilação e descarboxilação para *pentenil-pirofosfato*. A condensação de três moléculas do *isoprenóide pirofosforilado* forma o *farnesil pirofosfato*, e a posterior condensação forma o *esqualeno*, que é convertido em *lanosterol*. Este último é o precursor do colesterol.

Além de ser sintetizado no fígado, o colesterol é também parte da dieta, tanto na forma livre quanto na forma esterificada com ácidos graxos. Por não ser considerado um nutriente essencial, não há nenhum requerimento de sua ingestão, pois o organismo é capaz de sintetizá-lo em quantidade suficiente. O seu nível no plasma, em muitas pessoas, mantém-se inalterado mesmo depois de ingerido. Este mecanismo de controle diminui a quantidade sintetizada de colesterol quando se aumenta sua ingestão.

O colesterol absorvido leva à formação do complexo *lipoproteína-colesterol*, que regula a sua síntese endógena, inibindo a redução do HMG-CoA para ácido mevalônico (Figura 3.13) pela redutase, localizada na membrana microsomal. Este mecanismo está ausente em certa percentagem na espécie humana; altos níveis de colesterol no plasma são conseqüências da elevada síntese (predisposição genética). Portanto, restringir a ingestão de colesterol não reduz o seu nível no sangue. Em média, um indivíduo adulto é capaz de sintetizar de duas a quatro vezes mais colesterol que a quantidade ingerida para satisfazer sua necessidade de manutenção das estruturas das membranas, na biossíntese de hormônios esteróides e de ácidos biliares.

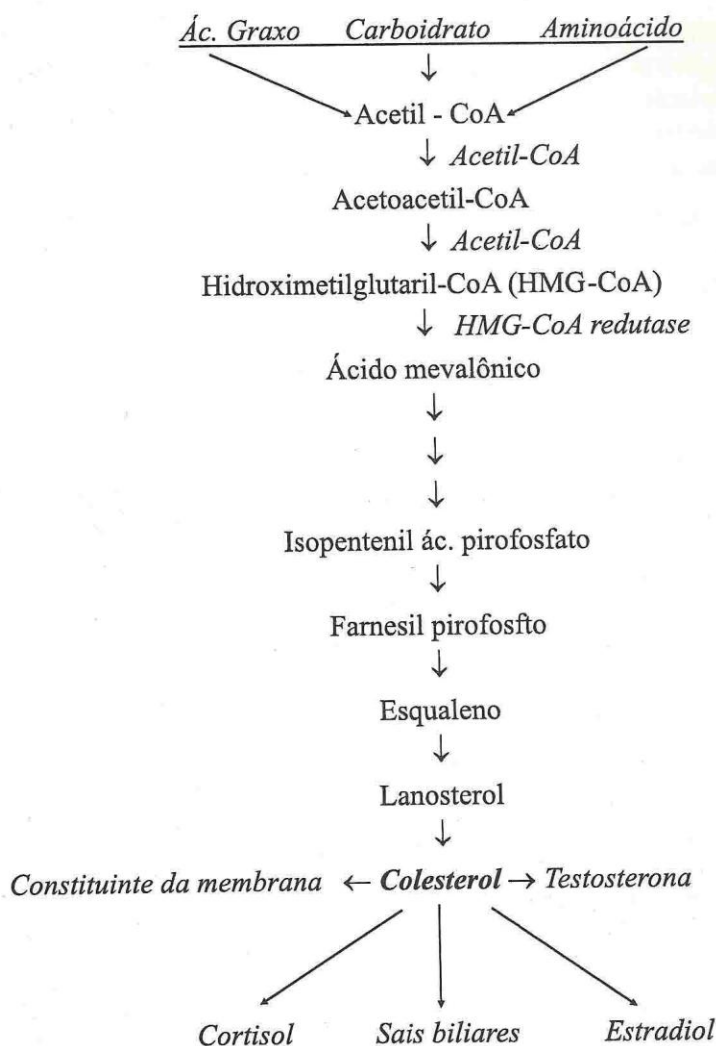


Figura 3.13 - Síntese do colesterol.

Por outro lado, vale mencionar que o colesterol é um esterol precursor de diversas e importantes moléculas no organismo animal, como a vitamina D₃ (importante no metabolismo do cálcio), sais biliares (na digestão de lipídios), glicocorticóides (no controle do metabolismo de

carboidratos), mineral corticóides (no metabolismo do sódio), e estrogênios e progesterona (hormônio de reprodução). Outro fato importante é que o colesterol é sintetizado no organismo em razão da sua função metabólica, portanto, se não ingerimos o colesterol pelo alimento, este será produzido naturalmente.

Questões têm sido levantadas sobre a extensão da influência da dieta sobre o colesterol e a relação deste com as doenças coronarianas. A hipótese de que a hipercolesterolemia é a principal causa de doenças coronarianas tem sido atribuída à ingestão de lipídios. Entretanto, nos últimos anos, a relação entre os produtos oriundos da oxidação de lipídios e as doenças cardiovasculares tem ganhado considerável suporte científico; ou seja, lipídios oxidados são mais prejudiciais às artérias que o lipídio nativo. É óbvio que a diminuição da ingestão de lipídios reduz a exposição dos produtos oriundos da sua oxidação; portanto, o colesterol é considerado inócuo, a menos que seja convertido em produtos oxidados (Figura 3.14).

A hipótese "resposta à injúria" explica a arterioesclerose como uma resposta inflamatória crônica à injúria do endotélio, culminando com interações celulares e moleculares complexas. A formação elevada de radicais livres, provocada pelos estímulos inflamatórios e outros, promove a oxidação da fração lipídica do LDL. Os produtos desta oxidação são bioativos e induzem à secreção de citocinas, os fatores de crescimento e de diversas moléculas com propriedades adesivas na superfície da célula, além de inibirem a produção de vasodilatadores (prostaciclina e óxido nítrico). Em resposta aos fatores de crescimento e à citocina, as células da musculatura lisa proliferam, resultando no estreitamento do lúmen.

O colesterol, como os lipídios insaturados, é oxidado com a formação de peróxido de forma similar aos ácidos graxos insaturados. A sua oxidação resulta na formação de diversos derivados oxigenados (Figura 3.14), denominados óxidos de colesterol, os quais podem ser formados durante o processamento do alimento ou *in vivo*.

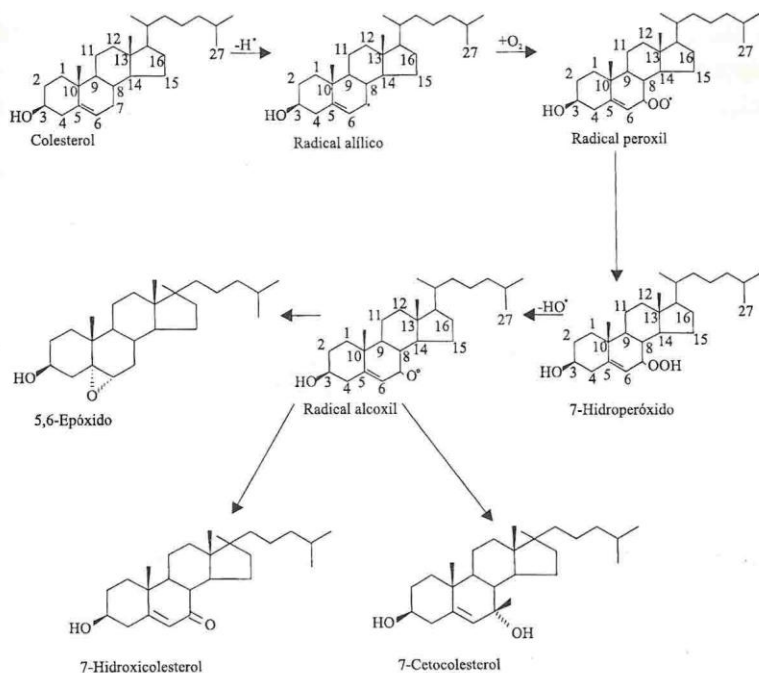


Figura 3.14 - Oxidação do colesterol.

A auto-oxidação do colesterol é iniciada pela remoção do hidrogênio na posição C-7, com a formação do radical livre. Este reage com o oxigênio triplete (3O_2), formando o radical peróxil; posteriormente é estabilizado pela remoção de outro átomo de hidrogênio, formando peróxidos isoméricos, os quais são termicamente instáveis, dando origem a diversos produtos secundários. De forma semelhante à fotoxidação dos ácidos graxos, o colesterol pode ser também oxidado pela ação do oxigênio singlete (1O_2), obtido a partir do oxigênio triplete pela ação fotoquímica, em diversos derivados.

Os derivados da oxidação do colesterol podem também ser formados em situação de deficiência de antioxidantes naturais. Neste caso, o colesterol é utilizado como antioxidante, e os produtos desta reação com os oxidantes endógenos são os óxidos de colesterol. Alto consumo de ácidos graxos polinsaturados e baixa ingestão de antioxidantes (vitaminas E e C, selênio, polifenóis) estão correlacionados

com a elevada oxidação do LDL, e a presença de óxido de colesterol nesta lipoproteína afeta a permeabilidade endotelial.

Em alimentos, os fatores que afetam a oxidação do colesterol são pH, a_w , oxigênio, temperatura, radiação, fotossensores, metais, tempo de armazenamento e teor de colesterol. A adição de antioxidantes (BHA, BHT, GP, tocoferóis) previne a sua oxidação.

Proteção do LDL por Antioxidante

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são complexos constituídos de lipídios e proteínas presentes no plasma sanguíneo rico em colesterol. A sua função é de suprir as células de colesterol. Para realizar esta tarefa, o LDL se liga inicialmente às proteínas receptoras localizadas na superfície da célula, para então transferir o colesterol para o seu interior. Elevado plasma colesterol (> 250 mg/100 ml) significa que esses receptores não funcionam adequadamente, de forma que o nível de LDL sanguíneo e de colesterol se torna muito elevado, aumentando a sua disponibilidade para a oxidação. As proteínas associadas à membrana podem então ser danificadas pelos radicais livres formados pela oxidação de lipídios.

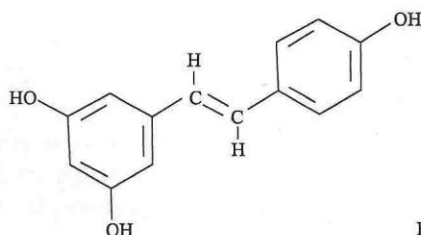
A oxidação do LDL é um processo mediado por radicais livres, resultando em diversas alterações funcionais e estruturais. O processo inicial ocorre pela oxidação de ácidos graxos polinsaturados presentes no LDL, pela remoção do ($\cdot$ H) presente nas insaturações pelas espécies reativas oriundas do oxigênio, seguido do rearranjo da molécula com a formação de ligações duplas conjugadas (Capítulo 1). Durante este processo, a velocidade da oxidação depende dos antioxidantes endógenos. Após sua exaustão na fase de propagação, outro ($\cdot$ H) é removido pelo radical peróxil ($\text{ROO}\cdot$) de outra molécula de ácido graxo insaturado, resultando na formação do peróxido. O colesterol no LDL pode ser então oxidado para oxisteróis. A fase de propagação é seguida da fase de decomposição ou degradação, ocorrendo formação de aldeídos como o malonaldeído, hidroxinonanal e hexanal, os quais podem provocar a formação de ligações cruzadas com grupos amina da proteína do LDL.

está relacionado com a regeneração do α -tocoferol (Figura 3.11) associado às lipoproteínas, e a ação do ácido úrico se verifica pela formação de complexo com metais. Este último, produto final do metabolismo das purinas, não pode ser utilizado como suplemento na dieta, pois quantidades elevadas levam à formação de “gota”.

O sistema enzimático descrito no Quadro 3.1 é complementado pela ação de antioxidantes oriundos da dieta. Embora ainda não existam evidências *in vivo* de que a ingestão de vinho tinto (alta concentração de compostos fenólicos: 1.800- 3.200 mg/L e trans-resveratrol: 3,5,4'-triidroxiestilbeno: 0,44-11,67 mg/L) (Tabela 3.6) reduz a oxidação de LDL, estudos realizados *in vitro*, monitorando a formação do hexanal via autooxidação do LDL catalisado pelo Cu^{++} , confirmam a redução de forma mais eficiente que o tocoferol. Se consumido regularmente de forma moderada, em níveis de 150-300 mL/dia, isto representa o suprimento de antioxidantes equivalente a 50-100 mg da enzima superóxido dismutase, o que certamente oferece proteção adicional à inibição da oxidação *in vivo* dos componentes celulares.

Tabela 3.6 - Principais constituintes fenólicos em vinho

Fenol	Vinho tinto (mg.ml ⁻¹)	Vinho branco (mg.ml ⁻¹)
Catequina	191-360	35
Epicatequina	82-100	21
Ácido gálico	95	7
Cianidina	3	0
Quercetina	8-10	0
Miricetina	9	0
Resveratrol	1,5	0



Resveratrol

Colesterol no Processamento de Alimentos

No processamento de alimentos, o colesterol é facilmente oxidado na presença de ar, especialmente quando aquecido, e alguns dos produtos formados podem se acumular nas paredes arteriais. Sabe-se que uma quantidade substancial de colesterol é obtida pela dieta e que vários alimentos utilizados são aquecidos antes do seu consumo. Diversas operações utilizadas no processamento do alimento podem induzir a formação de óxidos de colesterol:

- 1) Aquecimento do alimento com ar.
- 2) *Spray drying*, utilizando aquecimento direto.
- 3) Irradiação com a luz fluorescente na presença de ar.
- 4) Incorporação de agentes oxidantes.
- 5) Desidratação.
- 6) *Freeze drying*.
- 7) Fritura em gordura animal.
- 8) Enlatamento.

Os produtos oriundos da oxidação do colesterol (Figura 3.14) são rapidamente absorvidos e incorporados nas lipoproteínas de alta densidade, baixa densidade e muito baixa densidade. Estudos têm demonstrado que os produtos derivados da sua oxidação, e não o colesterol, são os responsáveis pelos efeitos citotóxicos, aterogênicos, angiotoxicos e enzimáticos. Os óxidos de colesterol inibem a síntese de colesterol, resultando na diminuição de seu nível nas membranas e ocasionando injúria celular, resultante do mal funcionamento (afeta o transporte de íons, principalmente cálcio, e a permeabilidade aos cátions divalentes e glicose). Portanto, a prevenção da oxidação de lipídios, em vez da remoção do colesterol da dieta humana, é importante fator a ser considerado na prevenção de doenças coronarianas.

O colesterol, na ausência de fatores que induzem à oxidação, é estável; entretanto, pode ser auto-oxidado em diversas circunstâncias. O processo oxidativo é acelerado pelo oxigênio, calor e pela exposição à luz UV. O carbono localizado na posição 7 (Figura 3.14) da molécula do colesterol é sensível ao ataque do oxigênio; mais de 60 compostos diferentes já foram identificados.

Dentre as principais fontes de colesterol na dieta (ovo, leite e carne), o ovo é o mais rico (0,5%). À exceção do ovo, os demais produtos são freqüentemente submetidos a vários tipos de processamento (aquecimento prolongado, iluminação durante o armazenamento etc.) antes de serem consumidos. Esses tratamentos são os responsáveis pela indução à oxidação do colesterol.

A gema de ovo “fresca” não possui substâncias oxidadas do colesterol, mas o produto industrializado (desidratado) contém várias: 7 α -hidroperóxido, 7 β -hidroperóxido, 25-hidrocolesterol, 7-cetocolesterol etc. O nível dessas substâncias aumenta durante o armazenamento, variando de 21 a 137 $\mu\text{g/g}$.

O processamento e o armazenamento por períodos prolongados do leite e derivados oferecem amplas oportunidades para a oxidação do colesterol, e várias delas estão presentes. O armazenamento da manteiga a 4 °C durante quatro a seis meses resulta no aumento da concentração do 5 α , 6 α -epóxi, 7 β -hidróxi e 7-cetocolesterol. A 16 °C, o efeito é ainda maior, e a exposição à luz fluorescente acelera a formação de produtos oxidados. A utilização de embalagens adequadas (alumínio) previne a reação fotooxidativa do colesterol.

No leite em pó e no condensado ocorre também a formação de diversas substâncias oxidadas; todavia, no leite pasteurizado, esterilizado e evaporado não ocorre a oxidação do colesterol. O aquecimento da gordura animal resulta na formação do 7-cetocolesterol, 7 α -hidróxi, 7 β -hidróxi e 5 α , 6 α -epoxicolesterol.

Alimentos de origem animal, como carne de boi, porco, frango e carneiro, gorduras do leite, peixes e ovos, são considerados as principais fontes de colesterol na dieta. Os teores, em alguns produtos, estão listados na Tabela 3.7.

Os produtos oriundos da oxidação do colesterol são encontrados em vários alimentos (Tabela 3.8). O aquecimento do colesterol na presença de oxigênio promove a rápida oxidação; e estes produtos têm sido detectados em alimentos como leite, ovo, carne e derivados, submetidos à temperatura elevada de processamento e a condições oxidativas, com tendência de aumentar durante o armazenamento.

Tabela 3.7 - Variação no conteúdo de colesterol de alguns alimentos de origem animal

Produto	Quantidade (mg/100 g)
Ovo inteiro (colesterol se encontra na gema)	385
Rim de porco	~600
Fígado	~400
Manteiga	240
Carne de porco / boi / carneiro	80 - 110
Carne de boi magra	42 - 78
Frango:	
peito	58 - 67
coxa	83 - 148
pele	109 - 130
Peru:	
carne branca assada	68 - 94
carne escura assada	74 - 130
Bacalhau	43 - 61
Camarão	97 - 164
Leite	14
Queijo	100
Peixe	60 - 100
Frutas/grãos/vegetais	0

Durante a secagem do ovo (*spray-drying*), o produto é atomizado e aquecido com ar quente. A grande área obtida pela atomização e a temperatura de secagem (60 °C) aceleram as reações entre os lipídios e o oxigênio molecular, formando diversos óxidos de colesterol. Alguns produtos oxidados são acumulados na parede arterial, e a utilização de antioxidantes retarda a sua oxidação.

Em produtos derivados do leite, o 7-cetocolesterol e 7-hidroxicolesterol são as espécies dominantes oriundas da oxidação do

colesterol. Ambos estão envolvidos na inibição da 3-hidróxi-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA redutase) (Figura 29), resultando na síntese insuficiente de colesterol e no mal funcionamento das células.

Tabela 3.8 - Níveis (ppm) de produtos oriundos da oxidação do colesterol durante o processamento e, ou, armazenamento

Produto	Níveis (ppm)
Carne de frango (lío­filizada)	8 - 78
Carne de boi (lío­filizada)	9 - 63
Alimento infantil (enlatado)	8 - 20
Ovo em pó	29 - 211
Batata frita	11 - 39
Queijo cheddar (ralado)	6 - 57
Manteiga	2,6 - 14
Manteiga aquecida (170 °C/10 min)	0,1 - 126
Peixe defumado	2,4 - 26,8
Peixe enlatado	2,0 - 37
Peixe salgado	0,05 - 257

Determinação de Compostos Fenólicos:

Extração

- Amostra: maçã/batata, descascar (1-2 mm de espessura).
- Tomar 5,0 g da casca moída em nitrogênio líquido (mortar).
- Transferir a amostra para o becker com a solução 70% metanol:água 1:1 (w/v).
- Homogeneizar, filtrar em papel de filtro Whatman nº 1.

Reagente Folin-Ciocalteu

- 0,2 mL da amostra + 10 mL do reagente Folin-Ciocalteu + 0,8 mL da solução de Na_2CO_3 (7,5% solução aquosa), agitar e deixar em repouso durante 30 min em temperatura ambiente.
- Fazer a leitura em 760 nm.
- * O teste em branco consiste da mistura de água e reagentes.

Curva padrão

- Utilizar o ácido gálico em metanol na concentração 0 – 600 $\mu\text{g/mL}$.
- Expressar o resultado em μg de ácido gálico equivalente/mL de solução da amostra.

REFERÊNCIAS

- ACQUAVIVA, R.; RUSSO A.; SORRENTI, C. Antioxidant activity and protective affect on DNA cleavage of resveratrol. *J. Food Sci.*, v. 67, p. 137-141, 2002.
- ARUOMA, O. F.; CUPPETT, S. L. **Antioxidant methodology in vivo and in vitro concepts**. New York: Academic Press, 1997. 241 p.
- ASTLEY, S. B. Dietary antioxidants – past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, v. 14, p. 93-98, 2003.
- BRANNAN, R. G.; CONNOLLY, B. J. Peroxynitrite: a potential initiator of lipid oxidation in food. *Trends in Food Science & Technology*, v. 12, p. 164-167, 2001.
- CAO, Y.; CAO, R. Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature*, v. 398, p. 381, 1999.
- CHIMI, H.; CILIARD, J.; RAHMANI, M. Peroxyl and hidroxil radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *J. Amer. Chem. Soc.*, v. 68, n. 5, p. 307-312, 1991.
- CHOE, E.; MIN, D. B. Chemistry and reactions of reactive oxygen species in food. *Journal of Food Science*, v. 70, p. 143-159, 2005.
- DIMITRIOS, B. Source of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, v. 17, p. 505-512, 2006.

EMULSÃO/EMULSIFICANTES

Introdução

Emulsão é um sistema heterogêneo que consiste em um líquido imiscível, completamente difuso em outro, na forma de gotículas com diâmetro superior a 0,1 micron. A formação de uma emulsão, portanto, requer energia para manter as gotículas dispersadas na fase contínua, sendo intrinsecamente instável; com o tempo, as gotículas da fase dispersa serão atraídas, resultando na separação das fases. As forças envolvidas na estabilidade da emulsão dependem do balanço das forças associadas com a interface do óleo e da água. Deduz-se, no entanto, que isso é termodinamicamente desfavorável e, por esse motivo, tal processo mostra estabilidade mínima, que pode ser aumentada pela adição de agentes ativos de superfície.

Para se fazer uma emulsão, é necessário óleo, água, emulsificante e energia (geralmente energia mecânica). A energia é necessária para deformar e romper os glóbulos, pela agitação intensa. Industrialmente utilizam-se homogeneizador de alta pressão para se produzirem gotículas de 0,2 μm de diâmetro, e o emulsificante é então transportado para a nova interface por convecção.

Para se obter estabilidade física, as emulsões requerem a adição de emulsificante que são moléculas ativas de superfície com propriedades anfífilas (interage com a interface do óleo e da água reduzindo a tensão superficial). Entretanto, os emulsificantes são capazes de interagir com outros componentes dos alimentos; portanto, a escolha é muito significativa para a estabilidade física e oxidativa da emulsão. A aparência visual de emulsão O/A será quase transparente se as gotículas

possuírem diâmetro de $0,03\ \mu\text{m}$; opaca, com diâmetro de $0,3\ \mu\text{m}$; e de coloração do óleo (geralmente amarela) para gotículas com $3\ \mu\text{m}$.

As emulsões são classificadas de acordo com a distribuição de suas fases: *óleo e água*. Se as gotículas de óleo estão dispersas na fase aquosa, é denominada emulsão do tipo *óleo/água* (O/A) (*maionese, leite, creme e sopas*). Quando, ao contrário, as gotículas de água estão dispersas na fase oleosa, tem-se a emulsão do tipo *água/óleo* (A/O) (*margarina, manteiga*). A substância que forma as gotículas em uma emulsão denomina-se fase *dispersa* ou *interna*, enquanto o líquido envolto é a fase *contínua* ou *externa*. (Figura 4.1).

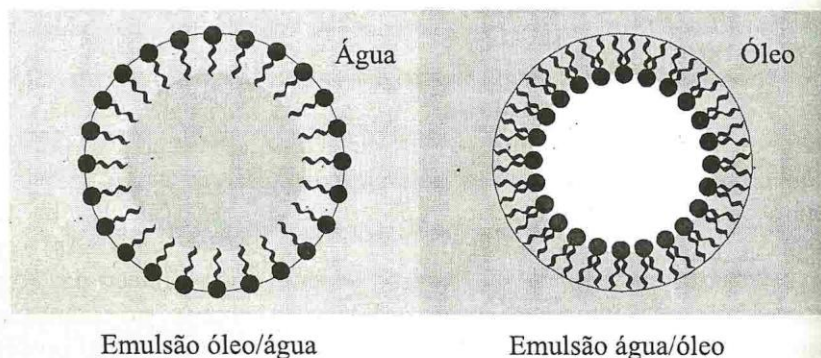


Figura 4.1 - Tipo de emulsão.

É possível formar uma emulsão homogeneizando (redução do tamanho das gotículas) óleo puro em água, mas as duas fases se separam rapidamente formando um sistema que consiste de uma camada de óleo (baixa densidade) no topo e de uma camada de água (alta densidade). Isto acontece em razão da tendência das gotículas de se colidirem, o que aumenta seu tamanho, ocorrendo, portanto, completa separação.

A força responsável por este processo advém do fato de o contato entre moléculas de óleo e da água ser energeticamente desfavorável, uma vez que as emulsões são um sistema termodinamicamente instável. No entanto, é possível formar emulsões cineticamente estáveis por um período de tempo razoável (dias, semanas, meses ou ano), adicionando-se

substâncias denominadas emulsificantes e, ou, espessantes antes da homogeneização.

Complexidade da Emulsão

A maioria das emulsões em alimentos é muito mais complexa que simplesmente os três componentes (óleo, água e emulsificante). A fase aquosa pode conter diversos ingredientes solúveis, incluindo moléculas de açúcares, sais, ácidos, bases, proteínas e carboidratos. A fase oleosa geralmente contém uma mistura complexa de componentes solúveis como triglicerídios, diglicerídios, monoglicerídios, ácidos graxos livres, esteróis e vitaminas. (Tabela 4.1). Os constituintes de uma emulsão interagem entre si, tanto física quanto quimicamente, determinando a característica físico-química e as propriedades organolépticas do produto final.

Tabela 4.1 - Ingredientes tipicamente encontrados em emulsão

Macrocomponentes	Microcomponentes
Água	Emulsificantes
Lipídios	Minerais
Proteínas	Gomas
Carboidratos	Flavor
	Pigmentos
	Conservantes
	Vitaminas

Conceitualmente, deve-se dividir a emulsão em três regiões distintas: interior das gotículas, fase contínua e região interfacial (Figura 4.2). A região interfacial pode conter uma mistura de vários componentes, incluindo-se proteínas, fosfolipídios, álcoois e partículas sólidas. Além disso, esses componentes podem formar vários tipos de entidades estruturais no óleo, na água ou nas regiões interfaciais, como cristais de gordura, cristais de gelo, agregados de proteínas, bolhas de ar e micelas. Adicional complicação advém das variações de temperatura, pressão e agitação mecânica a que está sujeito o produto durante sua

produção, armazenamento e distribuição, podendo causar alterações significantes em suas propriedades.

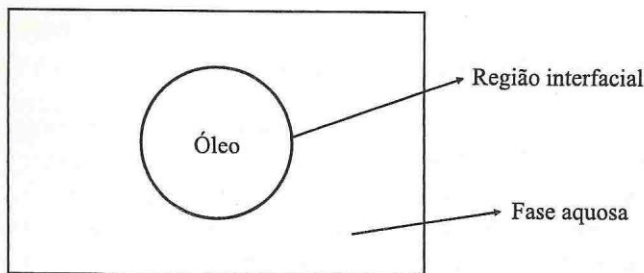


Figura 4.2 - Emulsão do tipo óleo/água.

Lipídios (óleos e gorduras)

Óleos e gorduras são partes de um grupo de compostos denominados lipídios, sendo os triacilgliceróis os tipos de lipídios mais comuns em alimentos. São passíveis de diversas alterações químicas durante o processamento, armazenamento e consumo do alimento, gerando substâncias que podem ser tanto desejáveis quanto indesejáveis ao *flavor*. O controle dessas reações requer o conhecimento da química dos lipídios e das emulsões. De modo geral, as emulsões são opacas em razão da dispersão da luz pelas gotículas.

As alterações químicas mais importantes que ocorrem naturalmente em óleos/gorduras são a *lipólise* e a *oxidação* (Capítulo 1). A lipólise é o processo de hidrólise da ligação éster por certas enzimas (lípsases) ou pela combinação do calor e da umidade, que tem como resultado a liberação de ácidos graxos, que pode ser tanto desejável quanto indesejável para a qualidade do produto. Além disso, os ácidos graxos livres são mais ativos na superfície que os triacilgliceróis, portanto acumulam-se preferencialmente na interface (óleo/água ou ar/água), aumentando a suscetibilidade à oxidação e a tendência de coalescência das gotículas da emulsão.

O termo oxidação de lipídios refere-se a uma série extremamente complexa de reações químicas envolvendo ácidos graxos insaturados e oxigênio. Por conveniência, essas reações são divididas em três diferentes estádios: *inicial*, *de propagação* e *terminal*. A reação inicial

ocorre quando o átomo de hidrogênio é removido do grupo metileno ($-\text{CH} = \text{CH}-$) do ácido graxo insaturado, formando radical livre ($-\text{CH} = \text{CH} - \text{CH}^{\bullet}-$). Este processo ocorre a partir de uma variedade de diferentes iniciadores presentes no alimento, incluindo peróxidos, íons metálicos de transição, luz UV e enzimas. É interessante notar que muitos destes iniciadores são predominantemente solúveis em água, os quais têm importantes implicações para a oxidação do óleo emulsificado. O iniciador precisa se movimentar através da membrana interfacial ou interagir ao longo desta para obter o contato com o óleo. Uma vez formado o radical livre, este reage com o oxigênio para formar o radical peroxil ($-\text{CH} - \text{COO}^{\bullet}-$). Esses radicais são altamente reativos e capazes de remover átomos de hidrogênio de outros ácidos graxos insaturados, propagando, portanto, a reação de oxidação. A reação terminal ocorre com a interação de dois radicais livres formando um não-radical e, assim, finalizando a sua participação na reação (Capítulo 1).

Durante a oxidação de lipídios, diversas reações de decomposição ocorrem simultaneamente, levando à formação de misturas complexas de produtos, incluindo *aldeídos*, *cetonas*, *álcoois* e *hidrocarbonetos*. Vários desses produtos são voláteis e, portanto, contribuem com o odor característico associado com a oxidação de lipídios. Alguns desses produtos são ativos na superfície e acumulam-se na interface *óleo/água* ou *ar/água*, enquanto outros são solúveis em água e, por isso, migram para a fase aquosa da emulsão.

Água

A molécula de água é composta de dois átomos de hidrogênio covalentemente ligados ao átomo de oxigênio (Figura 4.3). Por ser altamente eletronegativo, o átomo de oxigênio atrai os elétrons associados ao átomo de hidrogênio. Isto acarreta carga parcialmente positiva (δ^+) em cada átomo de hidrogênio e carga parcialmente negativa no átomo de oxigênio (δ^-). As pontes de hidrogênio são formadas entre pares solitários de elétrons do átomo de oxigênio da molécula de água e um átomo de hidrogênio da molécula de água vizinha ($\text{O} - \text{H}^{\delta+} \cdots \text{O}^{\delta-}$). Além de formar pontes de hidrogênio entre si, as moléculas de água são capazes de formar pontes de hidrogênio com as moléculas polares, como ácidos orgânicos, bases, proteínas e carboidratos.

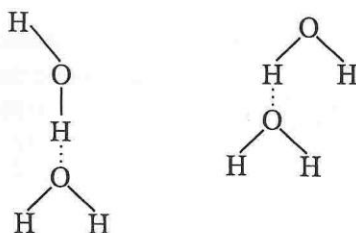


Figura 4.3 - Pontes de hidrogênio: quando a ligação O–H é linear com átomo receptor, a ponte de hidrogênio formada possui estabilidade máxima.

A fase aquosa da maioria das emulsões possui uma variedade de constituintes solúveis em água, incluindo minerais, ácidos, bases, *flavors*, conservantes, vitaminas, açúcares, emulsificantes, proteínas e polissacarídeos. A interação entre estes constituintes e moléculas de água determina a solubilidade, volatilidade, partição, conformação e reatividade química de vários ingredientes do alimento.

Muitos dos solutos presentes na emulsão podem ser iônicos ou capazes de ser ionizados, incluindo sais, ácidos, bases, proteínas e polissacarídeos. O grau de ionização de vários destes solutos é governado pelo pH da solução aquosa, portanto as interações são particularmente sensíveis ao pH.

As interações íon-dipolo, que ocorrem entre o soluto iônico e a molécula de água, são geralmente mais fortes que as interações dipolo-dipolo, que ocorrem entre pares de moléculas de água. Consequentemente, as moléculas de água presentes na vizinhança do íon tendem a se orientar de forma que as cargas opostas se voltem para o íon. Assim, íons carregados positivamente promovem o alinhamento das moléculas de água, de modo que o grupo parcialmente carregado (δ^-) se volte para o íon, enquanto o inverso (δ^+) também se volte para o íon carregado negativamente (Figura 4.4).

Vários ingredientes presentes no alimento possuem moléculas que contêm grupos dipolares incluindo álcoois, açúcares, proteínas, polissacarídeos e emulsificantes. A água é capaz de participar da interação dipolo-dipolo com os solutos dipolares. O tipo mais importante de interação dipolo-dipolo é entre água e os solutos doadores de hidrogênio

($-O-H^{\delta+}$) ou receptores ($^{\delta-}O-$). A força das pontes de hidrogênio entre água e este tipo de soluto dipolar é similar à que se observa entre duas moléculas de água. A adição de um soluto dipolar em água, entretanto, tem menos influência na mobilidade e organização das moléculas de água da vizinhança que o soluto iônico similar em tamanho. As interações entre grupos dipolares e a água determinam grande número de importantes propriedades dos componentes do alimento na emulsão.

A hidratação de grupos dipolares das moléculas dos emulsificantes são parcialmente responsáveis pela sua estabilidade à agregação. Quando o emulsificante é aquecido, os grupos polares se tornam progressivamente desidratados, provocando agregados de moléculas.

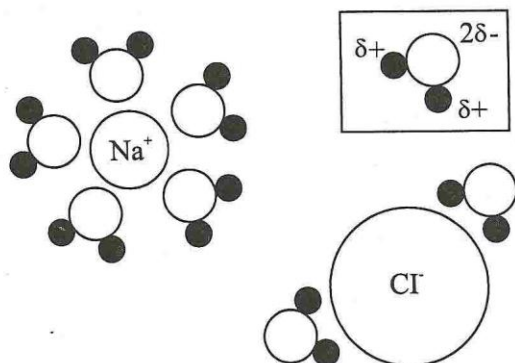


Figura 4.4 - Organização da molécula de água em torno de íons em solução aquosa.

As macromoléculas, como proteínas e alguns polissacarídeos, atuam também como emulsificantes, conferindo estabilidade à emulsão por longos períodos. Os emulsificantes mais comuns utilizados na indústria de alimentos são: *proteínas (caseína, soro, soja e ovo), fosfolipídios e pequenas moléculas de surfactantes com PM na faixa de 500 a 1.300 (polissorbatos, monoacilglicerol, lecitinas etc.).*

Como utilizado na indústria de alimentos, o termo emulsificante refere-se a moléculas de pequeno tamanho e não necessariamente confere estabilidade prolongada: *simplesmente possui a capacidade de adsorver rapidamente na nova superfície criada durante a emulsificação;*

portanto, protege as novas gotículas de óleo ou de água formadas de imediata coalescência. A estabilidade prolongada é obtida por proteínas ou polissacarídeos. O bom emulsificante mantém as gotículas separadas tão logo sejam formadas, protegendo a emulsão da coalescência durante o armazenamento prolongado.

Os emulsificantes naturais presentes no ovo e leite são utilizados para se elaborar emulsão em nível doméstico e industrial. Grande variedade de emulsificantes sintéticos é utilizada comercialmente, algumas vezes para melhorar a emulsificação e outras qualidades desejáveis ao produto durante o processamento, o armazenamento e a distribuição. De fato, muitos dos chamados emulsificantes são utilizados em certos produtos não com o propósito de emulsificação, mas visando o controle da cristalização da gordura e a inibição da retrogradação do amido.

Emulsões do tipo *óleo/água* são estabilizadas por emulsificantes solúveis em água, ao passo que as emulsões *água/óleo* são estabilizadas por emulsificantes solúveis em óleo.

Ação do Emulsificante

Os emulsificantes são moléculas ativas que aderem à superfície das gotículas formadas durante a homogeneização e constituem, assim, uma membrana protetora que impede que as gotículas se aproximem o suficiente, evitando a agregação. São moléculas *amfifílicas* (*possuem regiões polar e não-polar na mesma molécula*), e as mais utilizadas na indústria de alimentos são as *proteínas*, *pequenas moléculas de surfactantes* e *fosfolípidios*. Os agentes espessantes (polissacarídeos) são ingredientes utilizados para aumentar a viscosidade da fase contínua da emulsão, retardando a movimentação das gotículas e, portanto, aumentando a estabilidade.

A maioria das emulsões em alimentos compreende três regiões que apresentam diferentes propriedades físico-químicas: *interior das gotículas*, *fase contínua* e *interface* (Figura 4.2). As moléculas em emulsão distribuem-se nestas três regiões de acordo com a sua concentração e polaridade. As moléculas não-polares tendem a se localizar na fase oleosa, as polares, na fase aquosa; e as amfifílicas, na interface. As moléculas podem se mover de uma região para outra

quando ocorre alguma alteração nas condições em que se encontra (alteração na temperatura ou diluição).

A principal função dos emulsificantes é promover a formação e a estabilidade da emulsão; entretanto, podem também alterar suas propriedades de diversas maneiras (interagindo com proteínas ou com polissacarídeos). O emulsificante é uma molécula anfifílica que possui grupos hidrofílicos com afinidade pela água e um grupo lipofílico com afinidade pelo óleo. Os grupos polares podem ser aniônicos, catiônicos, zwitteriônicos ou não-iônicos.

Os emulsificantes utilizados pelas indústrias de alimentos são principalmente do tipo não-iônico, aniônico e zwitteriônico (ambos possuem os grupos positiva e negativamente carregados na mesma molécula, a exemplo da lecitina). A porção lipofílica consiste de uma ou mais cadeia de hidrocarbono contendo de 10 a 20 átomos de carbono. As cadeias podem ser saturadas ou insaturadas, linear ou ramificada, alifática e, ou, aromática. A maioria, utilizada em alimentos contém uma ou duas cadeias lineares alifáticas, podendo ser saturadas ou insaturadas. Cada tipo de emulsificante apresenta propriedades funcionais que são determinadas unicamente pela sua estrutura química, portanto nenhum emulsificante é apropriado para todas as aplicações.

Os emulsificantes capazes de promover a formação e a estabilidade de uma emulsão precisam ser adsorvidos pela superfície das gotículas durante a homogeneização, formando uma membrana protetora para evitar a agregação das gotículas durante a colisão. Os emulsificantes adsorvidos na interface do óleo-água adotam uma orientação na qual a porção hidrofílica dessas moléculas é localizada na água, enquanto a porção hidrofóbica é localizada no óleo. Esta situação minimiza a área de contato entre as regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, reduzindo a tensão superficial. Uma vez adsorvido na superfície das gotículas, o emulsificante gera forças repulsivas suficientemente fortes, para evitar a agregação das gotículas.

Os emulsificantes iônicos promovem a estabilidade na emulsão porque as gotículas apresentam cargas elétricas iguais, que, portanto, eletrostaticamente se repelem. Os não-iônicos promovem a estabilização, gerando diversas forças repulsivas e prevenindo a aproximação das gotículas como a interação estérica e hidratação. Alguns emulsificantes formam multicamadas na superfície das gotículas, aumentando a

estabilidade da emulsão. Em resumo, os emulsificantes têm de apresentar três características para serem efetivos na formação e na estabilidade da emulsão: *ser rapidamente adsorvidos na superfície das gotículas durante a homogeneização da emulsão recentemente preparada; ter capacidade de reduzir significativamente a tensão superficial; e ser capazes de formar uma camada interfacial que previna a agregação das gotículas.*

Cargas das gotículas

As propriedades organolépticas e físico-químicas de várias emulsões são determinadas pela magnitude e sinal das cargas elétricas das gotículas. Originadas da adsorção das moléculas do emulsificante que podem ser ionizadas, essas cargas possuem grupos hidrofílicos, que podem ser neutros, positiva ou negativamente carregados. As proteínas também apresentam as mesmas características, dependendo do pH da solução comparada ao seu ponto isoelétrico. Consequentemente, as gotículas da emulsão podem ter cargas elétricas que dependem do tipo de molécula ativa presente na superfície e do pH da fase aquosa. A carga na gotícula é importante para se determinar a natureza de suas interações com as outras espécies carregadas ou o seu comportamento na presença de campo elétrico. Duas espécies contendo cargas opostas são atraídas, mas com cargas similares são repelidas.

Todas as gotículas de uma emulsão são geralmente cobertas com o mesmo tipo de emulsificante, portanto possuem a mesma carga elétrica (se o emulsificante é ionizado). Quando esta carga é suficientemente grande, as gotículas são prevenidas da agregação devido à repulsão eletrostática entre elas. As propriedades da emulsão estabilizada por emulsificantes ionizados são sensíveis ao pH e à força iônica da fase aquosa. Se o pH da fase aquosa é ajustado de forma que o emulsificante perca a sua carga ou, se é adicionado sal, as forças repulsivas podem não ser suficientemente fortes para impedir as gotículas de se agregarem.

Interações moleculares

Na natureza existem quatro tipos distintos de forças: *nuclear forte, nuclear fraca, eletromagnética e gravitacional*. As partículas subatômicas interagem via forças nucleares fortes e fracas, formando

átomos. Os átomos interagem através de ligações co-valentes e iônicas, formando moléculas. Átomos e moléculas interagem por meio de várias forças co-valentes e não-co-valentes, formando fases separadas (podem ser gás, líquido ou sólido), solução simples, moléculas agregadas e partículas coloidais.

As forças nucleares (fortes e fracas) atuam em distâncias extremamente reduzidas e são as responsáveis pela manutenção das partículas subatômicas unidas no núcleo. Como o rearranjo nuclear não ocorre em alimentos, não serão consideradas nesta discussão.

A força gravitacional é relativamente fraca, comparada com outras forças, e ativa em longas distâncias. É proporcional ao produto da massa do objeto envolvido, tornando-se, conseqüentemente, insignificante em nível de molécula, por ser a massa molecular extremamente pequena; entretanto, afeta o comportamento da emulsão.

As forças que atuam em nível molecular são todas de origem eletromagnética e podem ser convenientemente divididas em três tipos: *co-valentes*, *eletrostáticas* e *de Van der waals*.

Interações co-valentes

Envolvem o compartilhamento de elétrons da camada mais externa entre dois ou mais átomos, de forma que o átomo individual perca a sua natureza. O número de elétrons da camada externa do átomo determina sua valência (número ótimo de ligações co-valentes que pode ser formado com outros átomos).

As ligações co-valentes podem ser saturadas ou insaturadas, dependendo do número de elétrons envolvido. As ligações insaturadas tendem a ser curtas, fortes e mais rígidas que as saturadas. A distribuição de elétrons na ligação co-valente determina sua polaridade. Quando os elétrons são compartilhados igualmente entre os átomos, a ligação apresenta característica não-polar, mas quando eles são compartilhados de forma desigual, a ligação possui característica polar.

Reações químicas envolvem o rompimento e a formação de ligações co-valentes. As reações químicas que ocorrem na emulsão são similares às de ocorrência em alimentos (oxidação de lipídios, hidrólise de proteínas ou de polissacarídios, reação de Maillard entre açúcares

redutores e grupos amina livres). Entretanto, a velocidade e o caminho dessas reações são frequentemente influenciados pela localização física das moléculas envolvidas (se localizadas no óleo, na água ou na interface).

Interações eletrostáticas

Ocorrem entre espécies moleculares que possuem cargas elétricas permanentes, como íons e moléculas polares (Apêndices 3 e 4). O íon é um átomo ou molécula que ganhou ou perdeu um ou mais elétrons, obtendo carga positiva ou negativa permanente (Figura 4.5). Moléculas polares não possuem cargas livres (no geral, a molécula é neutra), mas, em razão da distribuição não-pareada de sua carga, apresentam momento dipolo.

Certos átomos são capazes de “puxar” elétrons das ligações covalentes para si mais fortemente que outros. Como consequência, adquire carga negativa parcial (δ^-), enquanto outros adquirem carga positiva parcial (δ^+). Se as cargas parciais dentro da molécula são distribuídas simetricamente, elas se anulam e a molécula não apresenta dipolo, mas, caso sejam distribuídas assimetricamente, a molécula apresentará dipolo. Por exemplo, o átomo de cloro no HCl “puxa” elétrons da ligação covalente mais fortemente que o átomo de hidrogênio, e o dipolo formado é $H^{\delta+}Cl^{\delta-}$.

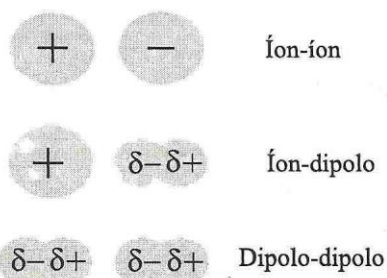


Figura 4.5 - Representação esquemática dos tipos de interação eletrostática.

A ionização de várias moléculas biológicas depende do pH do meio, portanto as interações eletrostáticas envolvendo estas moléculas são particularmente sensíveis ao pH. Por exemplo, uma proteína pode existir como uma molécula individual em solução, quando o pH se encontra longe do ponto isoeletrico em razão da forte repulsão eletrostática entre as moléculas de proteínas, mas pode ser precipitada, quando o pH da solução se encontra próximo do seu ponto isoeletrico, pelo fato de a repulsão eletrostática entre as moléculas não ser suficientemente forte para prevenir a agregação (Figura 4.6). A força das interações eletrostáticas entre as moléculas suspensas em solução aquosa é sensível ao tipo e concentração do eletrólito presente. Moléculas carregadas tendem a ser envolvidas por íons de carga oposta e eficientemente reduzem a interação eletrostática entre moléculas do mesmo tipo.

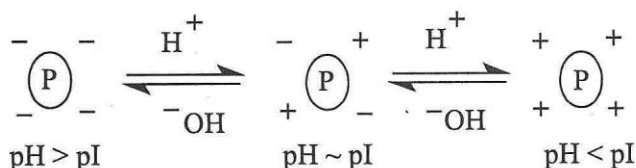


Figura 4.6 - Solubilidade da proteína em função do pH.

A interação eletrostática tem uma participação muito importante nas propriedades da emulsão, devido aos vários tipos de constituintes presentes, que podem ser tanto iônicos quanto dipolares (água, açúcar, sais, proteínas, polissacarídeos, ácidos e bases).

As gotículas presentes em diversas emulsões possuem em suas superfícies cargas elétricas devido à adsorção dos emulsificantes, os quais podem ser iônicos ou capazes de ser ionizados (proteínas, polissacarídeos e emulsificantes). Todas as proteínas apresentam grupamentos ácidos ($-\text{COOH} \rightarrow \text{COO}^- + \text{H}^+$) e básicos ($\text{NH}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_3^+$), sendo o grau de ionização dependente do pH e da força iônica do meio.

Algumas moléculas de polissacarídeos ativos de superfície, como o amido modificado e a goma arábica, apresentam também grupos ácidos que podem ser ionizados. Os emulsificantes iônicos podem ser tanto positiva quanto negativamente carregados, dependendo da natureza de seu grupo hidrofílico. A magnitude e o sinal da carga elétrica das gotículas da emulsão, portanto, dependem do tipo de

emulsificante utilizado para estabilizá-lo, da concentração do emulsificante na interface e das condições do meio (pH, temperatura e força iônica). Todas as gotículas em uma emulsão são geralmente estabilizadas pelo mesmo tipo de emulsificante, logo possuem a mesma carga elétrica. A interação eletrostática entre as gotículas com carga similar é repulsiva, sendo, portanto, a principal interação no controle da agregação dessas gotículas.

Interação de Van der waals

A força de Van der waals atua em todos os tipos de espécies moleculares, sejam iônica, polar ou não-polar, e são convenientemente divididas em três formas (Figura 4.7).

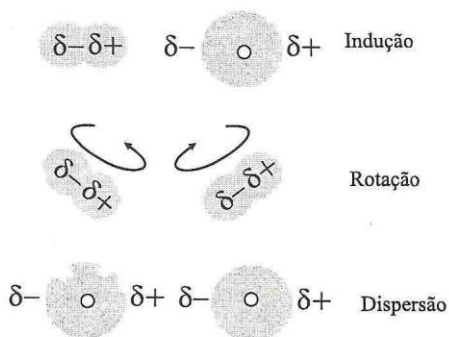


Figura 4.7 - Representação esquemática das interações intermoleculares de Van der waals.

Força de dispersão – Aparece pela interação entre um dipolo instantâneo e o dipolo induzido por moléculas localizadas na vizinhança. Os elétrons na molécula estão continuamente se movimentando em volta do núcleo. Em determinado momento ocorre uma distribuição não-pareada de elétrons carregados negativamente em torno do núcleo carregado positivamente, formando-se, então, o dipolo instantâneo. Este gera um campo elétrico que induz o dipolo em moléculas na vizinhança, ocorrendo, conseqüentemente, uma força atrativa instantânea entre os dois dipolos. Na média, a atração entre as moléculas é finita, embora a média da carga líquida envolvida seja zero.

Força de indução – Surge da interação entre o dipolo permanente e o induzido pela molécula vizinha. Esta provoca uma alteração na distribuição de elétrons da molécula presente na vizinhança, levando à formação de um dipolo induzido. A interação entre o dipolo permanente e o induzido promove a atração entre as moléculas.

Força de orientação – Advém da interação entre dois dipolos permanentes que estão continuamente em rotação. Em média, esses dipolos não possuem cargas livres; no entanto, ainda existe uma fraca força de atração entre eles, devido à indução ocasionada pelo movimento do dipolo no vizinho. Quando a interação entre os dois dipolos é suficientemente forte para promover o alinhamento, esta contribuição é substituída pela interação eletrostática dipolo-dipolo descrita anteriormente.

A compreensão da origem destas três contribuições de Van der waals é importante na predição da estabilidade das gotículas da emulsão. Embora a interação de Van der waals atue entre todos os tipos de espécies moleculares, ela é considerada mais fraca que a interação eletrostática. Por esta razão, ela é muito importante na determinação da interação entre moléculas não-polares, onde a interação eletrostática não contribui de forma significativa.

As interações moleculares em alimentos e em outros sistemas biológicos ocorrem na forma de *pontes de hidrogênio* e *interações hidrofóbicas*. Na realidade, esta terminologia é uma maneira simplificada para descrever certas combinações de interações que ocorrem entre grupos químicos específicos comumente encontrados em alimentos. Em ambas as formas, consiste das contribuições de vários tipos de energia oriunda de diferentes interações, como Van der waals e eletrostática.

Pontes de hidrogênio – Participam de forma crucial, determinando as propriedades funcionais de várias moléculas importantes presentes nas emulsões, incluindo a água, proteínas, lipídios, carboidratos, emulsificantes e minerais. São formadas entre pares de elétrons solitários de um átomo eletronegativo (como o oxigênio) e um átomo de hidrogênio de um grupo localizado na vizinhança ($O - H^{\delta+} \cdots O^{\delta-}$). A principal contribuição das pontes de hidrogênio é eletrostática (dipolo-dipolo), mas a força de Van der waals também participa de forma significativa.

Interações hidrofóbicas – São importantes no comportamento de vários ingredientes presentes na emulsão, particularmente lipídios,

emulsificantes e proteínas. Manifestam-se como uma força de atração que atua entre grupos não-polares separados pela água. Quando moléculas não-polares são introduzidas na água, estas provocam um rearranjo das moléculas de água vicinais.

As emulsões são sistemas microeterogênicos, com diferentes entidades estruturais, variando em tamanho, forma e propriedades físico-químicas, incluindo átomos, moléculas, agregados moleculares, micela, gotículas, cristais e ar. Muitas dessas estruturas possuem dimensões que variam de poucos nanômetros a micrômetros.

Classificação dos Emulsificantes

Como decidir qual emulsificante é o mais indicado para determinada emulsão? Existem diversos sistemas de classificação de acordo com as suas propriedades físico-químicas; entre eles o *baseado na solubilidade do emulsificante no óleo e, ou, na água; e o fundamentado na relação entre grupos hidrofóbicos e hidrofílicos (valores de BHL)*.

Quanto à primeira classificação, a fase na qual o emulsificante é mais solúvel formará a fase contínua da emulsão. Portanto, o emulsificante solúvel em água estabilizará emulsão do tipo *óleo/água*. Esta regra é aplicada a diversos emulsificantes, entretanto existem muitas exceções. Por exemplo, várias moléculas anfifílicas são altamente solúveis tanto numa fase como na outra, mas não formam emulsão estável, porque não são particularmente ativas na superfície ou não protegem as gotículas da agregação.

Com relação ao BHL, este é descrito por números que indicam a afinidade relativa da molécula do emulsificante pela água e, ou, óleo de acordo com a sua estrutura química. Alto valor de BHL significa que a molécula do emulsificante apresenta elevada relação de grupos hidrofílicos/hidrofóbicos e vice-versa. Pode ser calculado conhecendo-se o número e os tipos dos grupos hidrofílicos e lipofílicos presentes no emulsificante (Tabela 4.2). Os valores de BHL de determinado emulsificante informam a solubilidade em óleo e, ou, água e podem ser utilizados na predição do tipo de emulsão que será formado. Os emulsificantes de baixos valores de BHL (3 a 6) são predominantemente hidrofóbicos e dissolvem-se

preferencialmente em óleo estabilizando emulsão do tipo *água/óleo*. No outro extremo, emulsificantes com elevados valores (8 a 18) são predominantemente hidrofílicos e dissolvem-se preferencialmente em água estabilizando emulsão do tipo *óleo/água*. No caso de valores intermediários (6 a 8), não há preferência pela água ou óleo.

Tabela 4.2 - Valores de BHL para emulsificantes comerciais

Nome Comercial	Designação química	Tipo	BHL
SPAN 85	Trioleato de sorbitana	N	1,8
SPAN 65	Triestearato de sorbitana	N	2,1
ATLAS 2158	Monoestearato de propileno glicol	N	3,4
ATMUL 500	Mono e diglicerídeo	N	3,5
ATMUL 84	Monoestearato de glicerol	N	3,8
SPAN 80	Monooleato de sorbitana	N	4,3
SPAN 60	Monoestearato de sorbitana	N	4,7
SPAN 40	Monopalmitato de sorbitana	N	6,7
SPAN 20	Monolaurato de sorbitana	N	8,6
TWEEN 61	Monoestearato de polioxietileno sorbitana	N	9,6
TWEEN 81	Monooleato de polioxietileno sorbitana	N	10,0
TWEEN 65	Triestearato de polioxietileno sorbitana	N	10,5
TWEEN 85	Trioleato de polioxiet. sorbitana	N	11,0
WYRJ 45	Monoestearato de polioxietileno	N	11,1
ATLAS 2142	Monooleato de polioxietileno	N	11,4
ATLAS 2127	Monolaurato de polioxietileno	N	12,8
TWEEN 21	Monolaurato de polioxietileno sorbitana	N	13,3
TWEEN 60	Monoestearato de polioxietileno sorbitana	N	14,9
MYRJ 49	Monoestearato de polioxietileno	N	15,0
TWEEN 80	Monooleato de polioxietileno sorbitana	N	15,0
TWEEN 40	Monopalmitato de polioxietileno sorbitana	N	15,6
MYRJ 51	Monoestearato de polioxietileno	N	16,0
ATLAS 2129	Monolaurato de polioxietileno	N	16,3
TWEEN 20	Monolaurato de polioxietileno sorbitana	N	16,7
MYRJ 52	Monoestearato de polioxietileno	N	16,9
ESTERLAC E	Estearoil 2-lactil lactato de sódio	I	21,0
	Lecitina	I	VAR.

N: não-iônico, I: iônico.

As gotículas de uma emulsão tendem a se agregar quando são estabilizadas com emulsificantes com elevado valor de BHL. Nesta situação (BHL elevado), o emulsificante possui baixa atividade de superfície, pois não acumula em quantidades apreciáveis nas superfícies das gotículas, portanto não oferecendo proteção adequada à coalescência.

Com valores intermediários (6 a 8), as emulsões são instáveis em virtude de a tensão superficial ser muito pequena, necessitando de pouca energia para romper a membrana. Estabilidade máxima de uma emulsão O/A é obtida utilizando-se emulsificantes com BHL entre 10 e 12 e, de uma emulsão do tipo A/O, em torno de 3 a 5. Isto se explica pelo fato de os emulsificantes, apesar de ser ativos de superfície, não diminuírem suficientemente a tensão superficial, de forma que as gotículas são facilmente rompidas. É possível ajustar os valores de BHL pela combinação de dois ou mais emulsificantes com diferentes valores.

O conceito de BHL não leva em consideração as alterações significativas nas propriedades funcionais da molécula do emulsificante, quando se altera a temperatura ou as condições da solução, além de não informar a quantidade requerida do emulsificante necessário para se obter uma emulsão estável. A velocidade em que o emulsificante adsorve na superfície das gotículas da emulsão formadas durante a homogeneização determina o tamanho mínimo das gotículas a serem formadas: *rápida adsorção, menor tamanho*. Portanto, a quantidade do emulsificante necessário para estabilizar a emulsão depende da superfície total da área das gotículas, assim como a superfície da área a ser coberta por unidade de massa depende do emulsificante.

Balanco hidrofílico lipofílico (BHL)

É uma expressão numérica relativa da atração simultânea do emulsificante pela água e pelo óleo, cujo valor informa a solubilidade do emulsificante em óleo ou água, mas não a sua eficiência. Determinado emulsificante que possua a porção lipofílica relativamente forte e a porção hidrofílica fraca é, predominantemente, solúvel em óleo e, conseqüentemente, atua, de preferência, como estabilizante em emulsão do tipo A/O; isto também é válido para o caso inverso.

Os valores de BHL encontrados na literatura (Tabela 4.2) são obtidos por meio de cálculos a partir da estrutura molecular do

emulsificante. E isso causa alguns problemas, visto que os emulsificantes comerciais não são completamente puros; logo, os valores calculados devem ser utilizados com precaução. Em virtude de sua estrita relação com a estrutura molecular e da natureza dos alimentos, sua utilidade é, em alguns casos, limitada. Isto significa que variações nas propriedades do óleo ou da fase aquosa, em função da presença de certas substâncias (carboidratos, proteínas etc.), não são levadas em consideração no cálculo do BHL. A presença de tais componentes pode fazer com que estes interajam com o emulsificante adicionado, ocasionando mudanças em suas propriedades. Além do mais, outros fatores não são considerados, por exemplo a concentração, a temperatura, a ionização e o comportamento mesomórfico do emulsificante.

Cálculos do BHL

Para a maioria dos ésteres de ácidos graxos com álcoois polidroxilados, os valores de BHL são determinados pela *equação de Griffin*.

1 - Tomando-se como exemplo o *monoestearato de glicerol*:

- Índice de saponificação do éster (S) = 161
- Índice de acidez do ácido graxo (A) = 198
- Equação de Griffin: $BHL = 20 (1 - S/A) : BHL = 3,8$

2 - Para o caso de mistura de emulsificantes de forma a obter o valor final, por exemplo, de $BHL = 12,0$:

- Emulsificante A, com $BHL = 15,0$
- Emulsificante B, com $BHL = 4,0$

$$\% A = 100(BHL_f - BHL_b) / BHL_a - BHL_b$$

$$\% A = 72,0 \text{ e } \% B = 28,0$$

3 - Para a determinação do peso em % do grupo hidrofílico presente na molécula, tomando-se como exemplo o *monooleato de polioxietileno sorbitana (Tween 80)*:

Quadro 4.1 - Agentes ativos de superfície em alimentos**A: Ocorrência natural**

1. Iônico: proteínas, fosfolipídios, lecitina
2. Não-iônico: glicolipídios, saponinas

B: Sintético

1. Iônico: estearoil-2-lactilato
2. Não-iônico: mono e diglicerídios e seus ésteres: acético, cítrico, tartárico, láctico, sacarose, sorbitana, polioxietileno

Os emulsificantes para alimentos são ésteres parciais de ácidos graxos de origem animal ou vegetal e álcoois polivalentes, como glicerol, propileno glicol, sorbitol, sacarose etc. Podem ser adicionalmente esterificados com ácidos orgânicos, como ácidos láctico, tartárico, succínico, cítrico etc.

Os emulsificantes pertencem à classe de compostos caracterizados por sua natureza anfifílica, apresentando, em sua estrutura química, segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos, espacialmente separados. Em função dessas características, os emulsificantes reduzem a tensão superficial na interface das fases imiscíveis, permitindo, portanto, que elas se misturem, formando a emulsão.

Os emulsificantes iônicos (Figura 4.9) estabilizam emulsões do tipo óleo/água. Na interface, os grupos alquila interagem com as gotículas de óleo, enquanto os grupos finais carregados se projetam para a fase aquosa. O envolvimento de íons contrários forma uma camada dupla, que previne a agregação das gotículas de óleo.

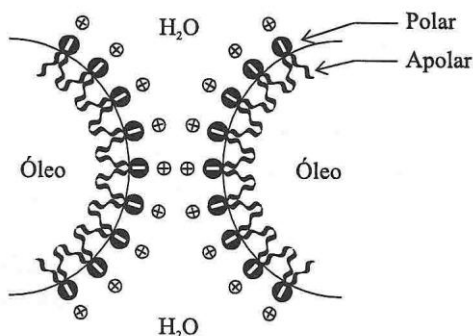


Figura 4.9 - Atividade do emulsificante iônico (emulsão O/A).

Os emulsificantes não-iônicos (Figura 4.10) são orientados na superfície das gotículas do óleo com a porção polar projetada para a fase aquosa. A coalescência (formação de gota de diâmetro maior) das gotículas de uma emulsão água/óleo é prevenida pela formação de uma camada hidratada em volta dos grupos polares.

A coalescência das gotículas de água na emulsão água/óleo primeiramente requer que as moléculas de água rompam as camadas duplas da região hidrofóbica da molécula do emulsificante. E isso somente é possível quando suficiente energia é aplicada para romper as interações hidrofóbicas do emulsificante. O aumento da temperatura afeta negativamente a estabilidade da emulsão. Outra forma de diminuir a estabilidade da emulsão seria adicionar-lhe íons, pois estes provocam o colapso da camada eletrostática dupla, ou a hidrólise, para destruir o emulsificante.

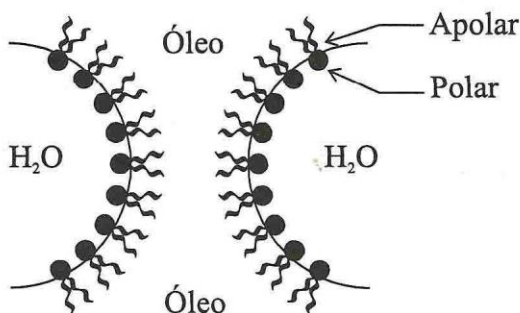


Figura 4.10 - Atividade do emulsificante não-polar (emulsão A/O).

A indústria de alimentos (Quadro 4.2) é considerada a maior consumidora de emulsificantes, e a panificação representa esse segmento industrial com maior consumo. O efeito positivo do emulsificante está relacionado com o aumento da aderência do amido à proteína e vice-versa.

Os métodos atuais de fabricação do emulsificante baseiam-se na (trans)esterificação em temperatura elevada, na presença de catalisadores alcalinos.

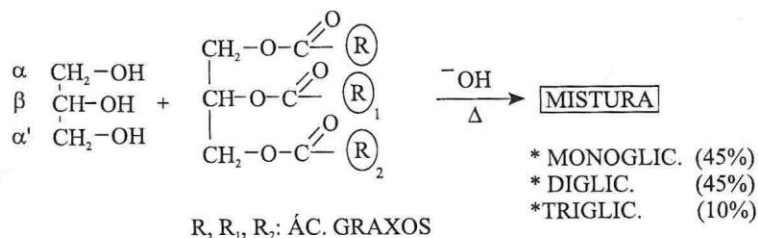
Quadro 4.2 - Exemplo da utilização de emulsificantes em alimentos industrializados

Produto	Efeito
Margarina/manteiga	Estabilização da emulsão A/O
Maionese/cremes/sopas	Estabilização da emulsão O/A
Sorvete	Estabilização da emulsão O/A
Salsicha	Prevenção da separação da gordura
Pães/derivados	Melhorias da estrutura da casca, do volume e da inibição da retrogradação do amido
Chocolate	Inibição da aglomeração da gordura
Pós instantâneos	Solubilização
Extrato de especiarias	Solubilização
Preparo de multivitaminas	Solubilização de vitaminas lipossolúveis/hidrossolúveis

Monoglicerídios

Comercialmente disponíveis, são uma combinação de *mono* e *diglicerídios*, entretanto o emulsificante funcional é somente a porção do monoglicerídio presente na mistura. Além disso, o monoglicerídio na posição *alfa* ou *1* é mais eficaz que na posição *beta* ou *2*. São preparados pela interesterificação do triglicerídio com excesso de glicerol em meio alcalino, conforme ilustrado na eq. 4.1.

eq. 4.1



Na obtenção de altas concentrações contendo no mínimo 90% de monoglicerídio, a destilação molecular é utilizada. Neste processo, a mistura anteriormente obtida é submetida a condições de temperatura elevada (200 °C) e pressão abaixo de 0,001 mm (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 - Composição comercial do monoglicerídio destilado

Composição	%
Monoglicerídios	94,2
Diglicerídios	3,6
Triglicerídios	0,7
Ácidos graxos	0,8
Glicerol	0,7

Derivados de monoglicerídios

As propriedades de um monoglicerídio podem ser alteradas pela adição de grupos funcionais ao glicerol (Figura 4.11).

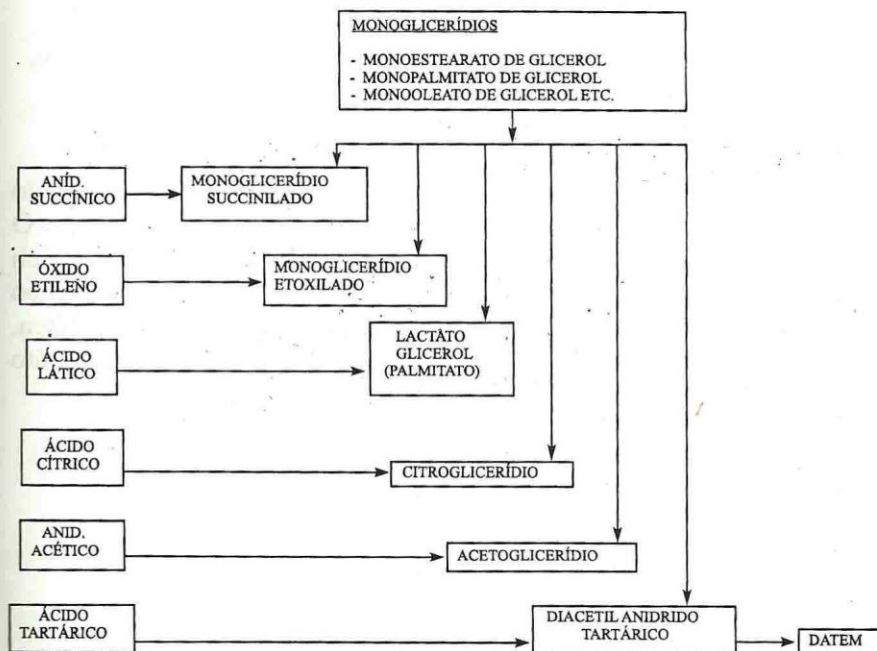
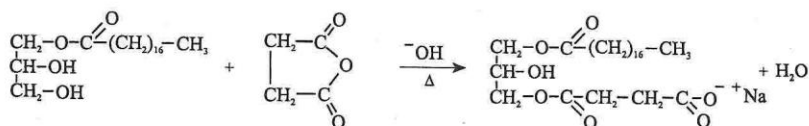


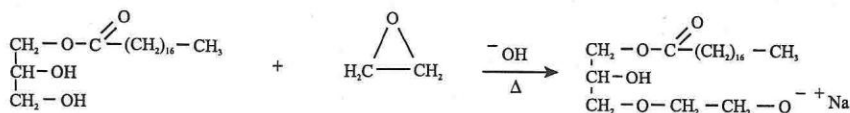
Figura 4.11 - Emulsificantes derivados de monoglicerídios.

Monoglicerídio succinato

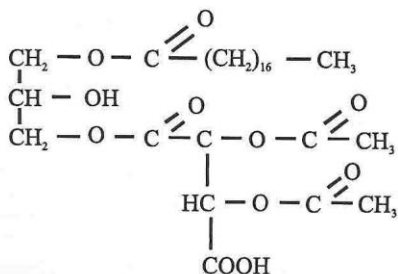
É obtido pela reação entre o monoglicerídio destilado e o anidrido succínico. Por sua característica de complexação com proteínas e amido, é muito utilizado na indústria de panificação.

*Monoglicerídio etoxilado*

De maneira similar, o monoglicerídio etoxilado é produzido pela reação entre o monoglicerídio e o óxido de etileno, resultando em um produto final hidrofílico, também utilizado em panificação.

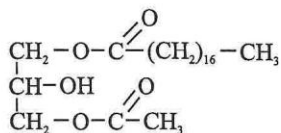
*Diacetil tatarato éster de monoglicerídio (DATEM)*

É o produto resultante da reação entre o anidrido acético e o ácido tartárico, que, posteriormente, vai reagir com o monoglicerídio. O produto final apresenta considerável porção hidrofílica, portanto é um emulsificante típico para emulsão O/A. Em virtude da presença do grupo carboxila livre, este emulsificante possui habilidade de se ligar ao glúten, melhorando a capacidade de retenção de gás, característica muito importante em panificação.

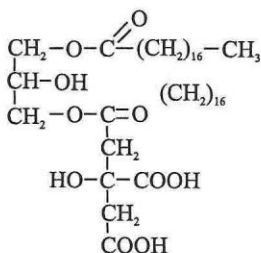


Acetoglicerídio

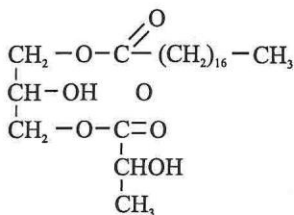
Produzido pela acetilação do monoglicerídio com anidrido acético. Por promover aglomeração, plasticidade e estabilização de espumas, é utilizado na indústria de carne (salsicharia) e em produtos de cobertura para doces.

*Citroglicerídios*

É obtido pela esterificação do ácido cítrico com o monoglicerídio e utilizado na indústria de carnes e margarina.

*Lactato de monoglicerídio*

Produzido pela esterificação do monoglicerídio com o ácido láctico e utilizado em panificação.



Derivados de ácidos graxos e álcoois (Figura 4.12)

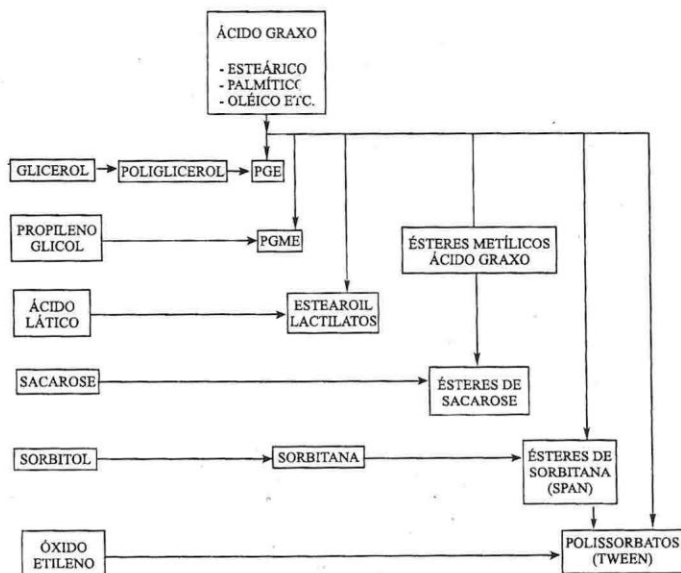
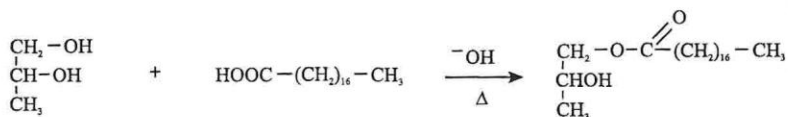


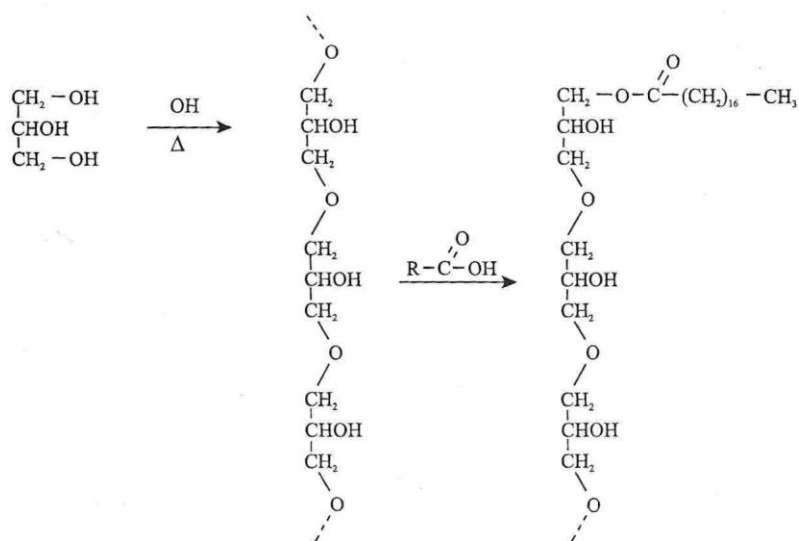
Figura 4.12 - Emulsificantes derivados de ácidos graxos.

Monoestearato de propileno glicol

Preparado pela esterificação do propileno glicol com o ácido esteárico.

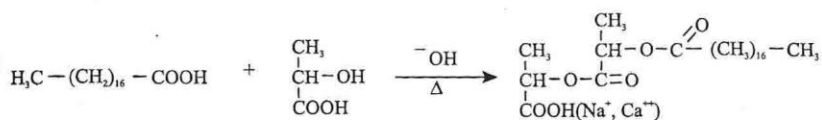
*Éster de poliglicerol*

A polimerização do glicerol em condições alcalinas e em temperatura elevada resulta em um polímero linear (poliglicerol), e, com a posterior esterificação direta com o ácido graxo, obtém-se o éster.



Estearoil lactilato

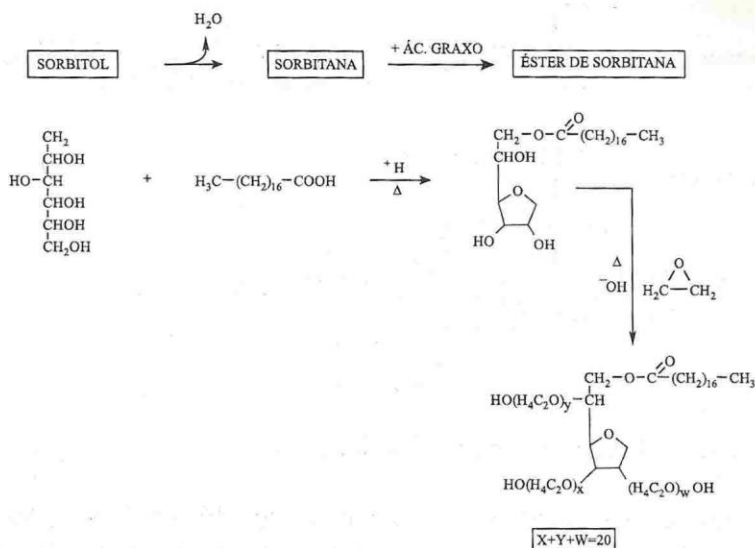
É obtido a partir da reação dos ácidos graxo e láctico e de uma fonte adequada de sódio ou cálcio. Em virtude de sua habilidade de complexar com amido e proteínas, é muito utilizado na indústria de panificação e amido; é o único emulsificante sintético com grupos dissociáveis utilizados em processamento de alimentos. O valor de BHL para o sal de sódio varia de 8 a 9 e o de cálcio, de 6 a 7.



Éster de sacarose

É obtido, dentre outros métodos, pela transesterificação do éster metílico do ácido graxo (14:0, 16:0, 18:0 e 18:1) com a sacarose. O éster resultante não apresenta sabor e odor. Dependendo da estrutura, cobre uma faixa de BHL de 7 a 13 e é utilizado na estabilização de emulsão do tipo O/A ou de alguns produtos em pó e desidratados.

eq. 4.12



Lecitina

Importante emulsificante natural. Tecnicamente, pode ser obtida a partir da gema de ovo e de diversas fontes de óleos vegetais. A fonte mais comum é a soja (2 a 3%), em virtude de sua contínua disponibilidade e propriedades emulsificantes. A lecitina comercial é uma mistura de diversos fosfolipídios dissolvidos em óleos (Tabela 4.4). Como é facilmente hidratada, pode ser removida do óleo durante a fase de degomagem (Figura 4.13).

Tabela 4.4 - Composição típica, em %, da lecitina de soja

Fosfolipídios	%
Fosfatidilcolina (lecitina)	20,0
Fosfatidiletanolamina	15,0
Fosfatidilinositol	20,0
Outros fosfatídios	5,0
Carboidratos e esteróis	5,0
Triglicerídios	35,0

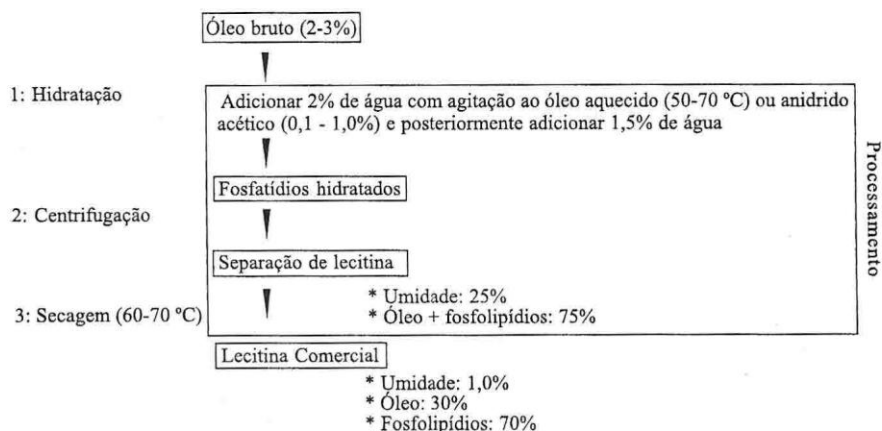


Figura 4.13 - Produção comercial da lecitina.

Os vários fosfatídios presentes na lecitina (Figura 4.14) apresentam valores de BHL, os quais resultam em propriedades típicas de emulsificação: a *fosfatidilcolina*, ou *lecitina*, estabiliza emulsão do tipo O/A, enquanto a *fosfatidiletanolamina* e a *fosfatidilinositol* estabilizam emulsão A/O. A presença destes fosfolipídios na lecitina resulta em fracas propriedades emulsificantes, tanto em emulsão O/A quanto em A/O. Além do mais, a fosfatidiletanolamina perde seu poder emulsificante e flocula em altas concentrações de sais de cálcio e magnésio presentes em água dura. Na obtenção de emulsões mais estáveis, a lecitina deve ser utilizada em combinação com outros emulsificantes.

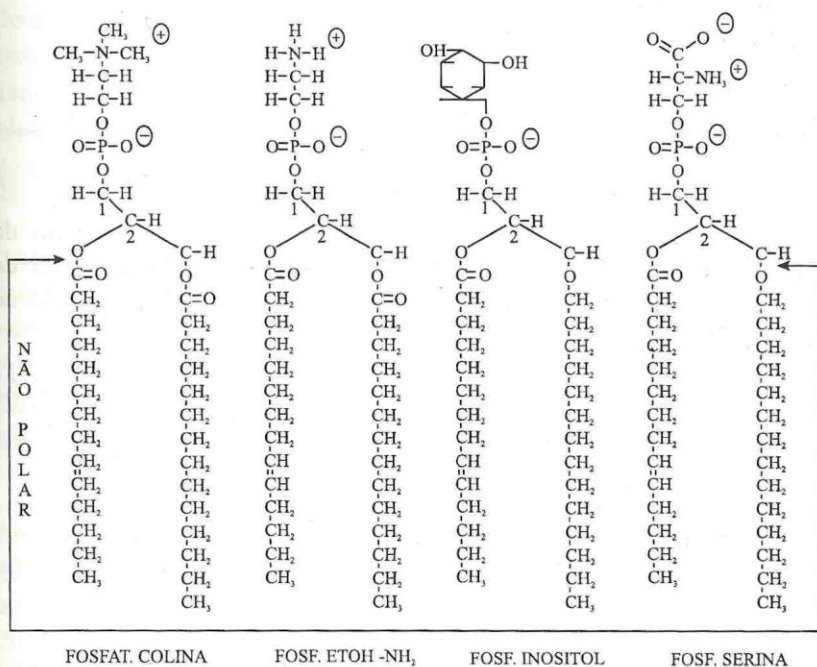
Modificações químicas e enzimáticas da lecitina

Em muitos casos, a lecitina comercial, após a remoção de seu óleo com acetona, pode ser química ou enzimaticamente modificada para melhoria de suas propriedades emulsificantes e redução de sua sensibilidade a íons metálicos. O princípio químico da modificação da lecitina baseia-se na remoção ou transformação da fosfatidiletanolamina. Tais modificações são realizadas utilizando-se as seguintes etapas:

Fracionamento alcoólico: Com base na solubilidade em álcool, lecitinas de diferentes composições em fosfolipídios e características de BHL podem ser obtidas (Tabela 4.5). A fosfatidilcolina é mais solúvel em etanol

que a fosfatidiletanolamina. Portanto, o fracionamento da lecitina com etanol 90% promove uma concentração da fosfatidilcolina, e o produto resultante apresenta melhor propriedade emulsificante em O/A (BHL = 14 - 15).

GRUPOS POLARES



Fosfatidilcolina: grupo fosfato esterificado com (OH)-COLINA

Fosfatidil ETOH-NH₂: grupo fosfato esterificado com (OH)-ETOH-NH₂

Fosfatidilinositol: grupo fosfato esterificado com (OH)-INOSITOL

Fosfatidilserina: grupo fosfato esterificado com (OH)-SERINA

Figura 4.14 - Estrutura química dos quatro principais fosfolipídios encontrados na soja. O comprimento exato dos ácidos graxos da região não-polar é variável.

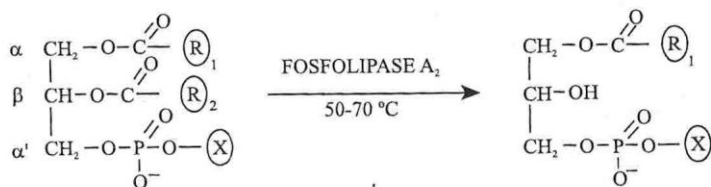
Embora a lecitina comercial seja utilizada em vários produtos, as frações obtidas pelo fracionamento alcoólico apresentam propriedades especiais que as tornam mais desejáveis.

Tabela 4.5 - Fracionamento da lecitina de soja em etanol

Fosfolipídio	% Peso do total da lecitina		
	Não-fracionada	Sol. ETOH	Ins. ETOH
Fosfatidiletanolamina	32,6	32,5	32,6
Fosfatidilcolina	32,6	65,1	4,6
Fosfatidilinositol	34,8	2,4	62,8
Tipo de emulsão	O/A ou A/O	O/A	A/O

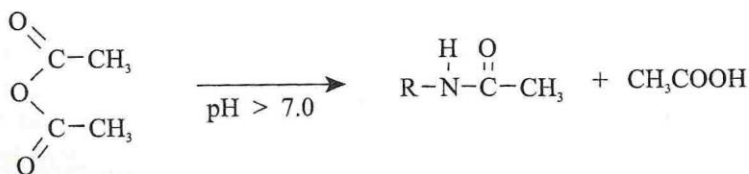
Hidrólise enzimática: A utilização da enzima *fosfolipase A₂* promove a hidrólise do ácido graxo na *posição beta* da molécula da lecitina. O produto final é mais hidrofílico e apresenta grande poder de emulsificação, em emulsão do tipo O/A, e reduzida sensibilidade ao cálcio (eq. 4.3).

eq. 4.3



Acetilação: O tratamento da lecitina com anidrido acético provoca a acetilação do grupo amina da fosfatidiletanolamina. O princípio deste procedimento é bloquear o grupo *zwitterion* da fosfatidiletanolamina, melhorando as propriedades emulsificantes em emulsão tipo O/A (eq. 4.4).

eq. 4.4



Emulsificantes Poliméricos

As interações de Van der waals sempre operam entre as gotículas da emulsão, e estas são suficientemente fortes para realizar a agregação dessas gotículas, a menos que existam suficientemente forças repulsivas para preveni-las de se aproximarem. Quando as gotículas de uma emulsão são envolvidas por uma camada de moléculas do emulsificante eletricamente carregado, estas podem ser estabilizadas contra a agregação pela repulsão eletrostática.

Embora vários tipos de emulsão sejam estáveis à agregação, mesmo sendo envolvidas por uma camada de moléculas de emulsificante que não apresentem cargas elétricas, outros tipos de interação repulsiva participam da sua estabilização. O mais importante destes ocorre pela presença de emulsificantes poliméricos na interface da emulsão tipo *óleo/água*. Para ser efetiva, esta interação tem de ser comparável às forças de Van der waals e a qualquer outra forma de interação.

A maioria dos emulsificantes utilizados na indústria de alimentos são parcial ou inteiramente polímeros: *proteínas* (polímeros de aminoácidos), *polissacarídios* (polímeros de açúcar) e diversos emulsificantes *não-iônicos*, os quais possuem grupos polares (polímeros de óxido de etileno).

A conformação do emulsificante polimérico na interface depende do número, tipo e seqüência de monômeros ao longo de sua cadeia. Um emulsificante tende a adotar uma conformação interfacial que minimiza a energia livre do sistema. Na prática, o principal fator determinante da conformação interfacial de um emulsificante é o efeito hidrofóbico (tendência de uma molécula em adotar um arranjo que minimize o número de contato desfavorável entre grupos polares e não-polares). Assim, moléculas do emulsificante de menor peso molecular adotam uma conformação em que a cadeia de hidrocarbono se aloja na fase oleosa, enquanto sua porção hidrofílica se aloja na fase aquosa (Figura 4.15).

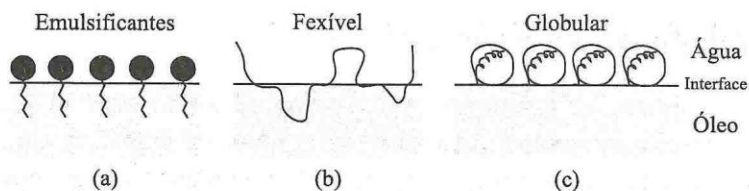


Figura 4.15 - Orientação dos emulsificantes poliméricos na interface da emulsão óleo/água: (a) emulsificante de baixo peso molecular, (b) polímeros flexíveis (caseína, amido modificado) e (c) polímeros globulares (proteínas globulares).

As proteínas e os polissacarídeos são os tipos mais importantes de biopolímeros utilizados como ingredientes em emulsão. As proteínas são polímeros de aminoácidos e os polissacarídeos, polímeros de monossacarídeos. As propriedades funcionais dos biopolímeros em alimentos são determinadas pelas características moleculares, como *peso molecular*, *conformação*, *flexibilidade*, *polaridade* e *interações*. Estas características são determinadas pelo tipo, número e sequência dos monômeros que fazem parte da cadeia do polímero.

Os mecanismos variam de acordo com a sua polaridade (iônico, dipolar, não-polar ou anfifílico), dimensões, interações e grupos funcionais. Se o biopolímero possui somente um tipo de monômero, denomina-se homopolímero (amido, celulose), mas, se apresenta diferentes tipos, é chamado de heteropolímero (goma arábica, xantana e proteínas).

Ambos, proteínas e polissacarídeos, possuem ligações co-valentes entre os monômeros, permitindo a rotação destes. Em razão disso e pelo fato de os biopolímeros conterem grande número de monômeros (entre 20 e 20.000), podem potencialmente apresentar diferentes configurações em solução. Na prática, o biopolímero tende a adotar uma conformação que minimize sua energia livre no meio em que se encontra (interações intermolecular e intramolecular). As configurações adotadas isoladamente em solução aquosa podem ser convenientemente divididas em três categorias: *globular*, *bastonete* (rod-like) e *enovelada* (random coil) (Figura 4.16).

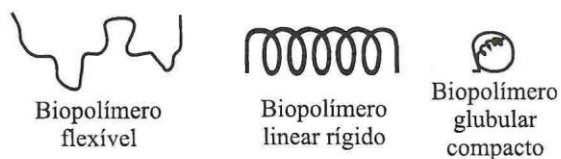


Figura 4.16 - Diferentes conformações em solução, dependendo de sua estrutura molecular.

Os *biopolímeros globulares* apresentam estrutura compacta e muito rígida; a *bastonete*, estrutura estendida e rígida (frequentemente helicoidal); e a *enovelada*, estrutura flexível. Podem também ser classificados de acordo com o grau de ramificação da cadeia. A maioria das proteínas possui cadeia linear, enquanto os polissacarídeos podem apresentar cadeia linear (amiloze) ou ramificada (amilopectina). Na prática, os vários biopolímeros não possuem exclusivamente um tipo de conformação, mas apresentam algumas regiões enoveladas, tubulares e globulares. Além disso, as moléculas de biopolímeros podem alterar a sua conformação, se ocorrerem alterações no meio, como pH, força iônica, composição do solvente e temperatura: *hélix* $\leftrightarrow$ *enovelada* ou *globular* $\leftrightarrow$ *enovelada*. Em solução, o biopolímero pode existir como molécula isolada ou se associar com outras por meio de:

Interações hidrofóbicas – Fundamentais na determinação da estrutura molecular e da agregação de biopolímeros, os quais possuem quantidades apreciáveis de grupos não-polares. Moléculas de proteínas contêm quantidades significantes de aminoácidos não-polares ao longo de sua cadeia, como *valina*, *leucina*, *isoleucina* e *fenilalanina*.

Os polissacarídeos são, em sua maioria, predominantemente hidrofílicos, mas alguns possuem grupos não-polares ligados à cadeia (goma arábica, amido modificado). Os biopolímeros que apresentam proporções significantes de grupos não-polares tendem a adotar conformação que minimize a área de contato entre grupos não-polares e a água, devido ao efeito hidrofóbico. Isto leva as proteínas que possuem grandes proporções de aminoácidos não-polares a se enovelarem na forma de estrutura globular compacta, na qual os aminoácidos não-polares são localizados na parte interna (longe da água), enquanto os polares são localizados na parte externa em contato com a água.

As interações hidrofóbicas são também responsáveis pela agregação e atividade de superfície dos biopolímeros anfifílicos. Agregando-se a outras moléculas não-polares ou adsorvendo-se à superfície não-polar, o biopolímero reduz a área de contato entre seus grupos hidrofóbicos e a água.

Interações eletrostáticas – Importantes na determinação da estrutura molecular e da agregação de vários biopolímeros. As proteínas contêm certos aminoácidos que podem se ionizar formando íons carregados positivamente (*arginina, lisina, histidina e grupo amino terminal*) ou íons carregados negativamente (*glutâmico, aspártico e grupo carboxila terminal*). Alguns polissacarídeos também possuem grupos ionizáveis em sua cadeia (*sulfato, carboxilato, fosfatos*). A carga líquida de uma molécula de biopolímero depende do pK de seus pares ionizáveis e do pH do meio.

As interações eletrostáticas envolvendo biopolímeros são, portanto, particularmente sensíveis ao pH da fase aquosa. Se determinado biopolímero possui muitos grupos com cargas similares, é muito provável adotar uma configuração estendida, devido ao aumento da distância média entre esses grupos, minimizando a repulsão eletrostática. Mas, se o biopolímero possui vários grupos carregados com cargas opostas, é mais provável se enovelar, formando estrutura compacta e minimizando as atrações eletrostáticas. Por essa razão, as proteínas são frequentemente compactas no seu ponto isoelétrico e se abrem com o aumento ou a diminuição do pH.

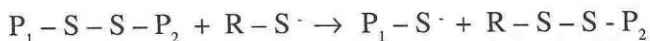
As interações eletrostáticas são também importantes na agregação de moléculas de biopolímeros em solução. Similarmente, os biopolímeros carregados se repelem e, portanto, tendem a existir como moléculas individuais, enquanto os de cargas opostas se atraem e, conseqüentemente, se agregam.

Pontes de hidrogênio – Tanto as proteínas como os polissacarídeos possuem monômeros capazes de formar pontes de hidrogênio, que são um tipo relativamente forte de interação molecular. Uma molécula de biopolímero pode adotar uma conformação capaz de maximizar o número de pontes de hidrogênio, formados entre os monômeros, levando à formação de regiões ordenadas como a hélice. Alternativamente, um biopolímero pode adotar estrutura menos ordenada pela formação de pontes de hidrogênio entre monômeros e as moléculas de água presente

no meio. Portanto, parte do biopolímero ou todo ele pode existir na forma altamente ordenada contendo pontes de hidrogênio intramolecular ou possuir conformação na forma mais enovelada, contendo pontes de hidrogênio intermolecular. A formação de pontes de hidrogênio é também responsável pela associação de vários tipos de biopolímeros. Os segmentos podem ser capazes de formar pontes de hidrogênio com segmentos de outras moléculas provocando a agregação.

Pontes de enxofre – A conformação e a agregação de várias proteínas são influenciadas pela habilidade de formar pontes dissulfídicas. A cistina é um aminoácido que possui grupo tiol ($-SH$), capaz de formar pontes de enxofre ($-S-S-$) com outros grupos tiol via reação de oxidação. Portanto, as proteínas, em condições apropriadas são capazes de formar pontes de enxofre *intramolecular* e *intermolecular*.

As pontes de enxofre intramoleculares são formadas quando pares de cisteína se aproximam devido ao enovelamento da molécula de proteína. Elas são importantes na estabilização da estrutura globular. Quando duas moléculas diferentes de proteínas se aproximam, formam-se as pontes intermoleculares, importantes na determinação da agregação de proteínas em gel e na interface. O valor de pK do grupo $-SH$ livre da cisteína é 8,3. Em proteínas, esse valor é maior e depende do meio onde se encontra o grupo $-SH$ e do grau de abertura da molécula. O íon $-S^-$ predomina em pH elevado e fortemente eletrofílico, sendo capaz de interagir com as pontes de enxofre, provocando o deslocamento nucleofílico:



P_1 / P_2 : refere-se à cadeia de polipeptídios, podendo ser da mesma proteína ou de moléculas diferentes.

$R - S^-$: na mesma ou em outra molécula de proteína.

Os grupos sulfidrilas e dissulfetos na proteína localizam-se geralmente no interior da molécula, estando, portanto, indisponíveis para a interação. A abertura da molécula da proteína expõe os grupos sulfidrilas, permitindo, em condições apropriadas, a troca interna do tiodissulfeto. Isso explica o aumento da troca sulfidrilas-dissulfeto que ocorre com o aquecimento da proteína, quando adsorvida na interface ou após o tratamento com enzimas proteolíticas, como a tripsina e quimotripsina.

Existe no mercado grande número de emulsificantes disponíveis para ser utilizados com ingredientes, tendo cada um característica própria e aplicação ótima. A eficiência de um emulsificante é determinada por diversas características, como a quantidade mínima requerida para produzir emulsão estável, sua habilidade para prevenir gotículas de se agregarem com o tempo, a velocidade na qual é adsorvida a superfície das gotículas durante a homogeneização, tensão superficial e espessura e elasticidade da membrana interfacial. Essas características dependem do alimento no qual o emulsificante está presente e das condições do meio (pH, força iônica, tipo de íon, tipo de óleo, interação de ingredientes, temperatura e agitação mecânica). Por essa razão, é muito difícil prever com precisão o comportamento do emulsificante a partir dos conhecimentos de sua estrutura química, embora previsões sobre algumas de suas propriedades funcionais sejam possíveis.

Proteína

A maioria dos alimentos que contêm gordura juntamente com outros ingredientes existe como emulsão, cujo tipo mais freqüente é óleo/água. Em virtude de sua natureza anfifílica, algumas proteínas são capazes de se orientar de acordo com a interface polar-não-polar, sendo, portanto, consideradas ótimos emulsificantes.

As proteínas, por serem moléculas anfifílicas, migram espontaneamente para a interface da emulsão O/A (em razão de sua insolubilidade, não podem ser utilizadas para emulsão tipo A/O), indicando que a energia livre da proteína é menor na interface que na fase aquosa. Assim, quando o equilíbrio é estabelecido, a concentração da proteína na região interfacial é sempre maior que na fase aquosa. Diferentemente dos emulsificantes de baixo PM, as proteínas formam um filme altamente visco-elástico na interface, com habilidade de resistir a choques mecânicos durante o armazenamento e a distribuição. Portanto, as proteínas que estabilizam a emulsão são mais estáveis que aquelas preparadas com os emulsificantes convencionais.

As proteínas diferem significativamente em suas propriedades ativas de superfície, o que não pode ser atribuído somente a seus resíduos hidrofóbicos/hidrofílicos, mas também a diferenças de sua conformação (estabilidade/flexibilidade da cadeia de polipeptídeo, adaptabilidade a

alterações do meio e a distribuição de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos na superfície da proteína).

A maneira como as proteínas são absorvidas na interface é diferente da dos emulsificantes de baixo PM, como os fosfolipídios e monogliceróis. Estes, em razão de as porções hidrofílica e hidrofóbica estarem presentes nas extremidades da molécula dos emulsificantes, não alteram sua conformação para efeito de adsorção e orientação. No caso das proteínas, a distribuição de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos na superfície e a rigidez estrutural da molécula limitam sua adsorção e orientação (Figura 4.15).

Moléculas altamente flexíveis, como as caseínas, alteram rapidamente sua conformação após a adsorção, permitindo que peptídios adicionais se liguem à interface. No caso das proteínas globulares, como as proteínas de soja, não ocorre a desejada alteração extensiva de sua conformação na interface.

A redução da tensão superficial essencial para se obter a emulsão é governada por três processos: *difusão das moléculas de proteína e sua incorporação na interface; abertura das moléculas de proteínas adsorvidas; e rearranjo molecular na superfície das moléculas adsorvidas*. A hidrofobicidade, a composição de aminoácidos e a flexibilidade estão envolvidas neste mecanismo.

Em razão das diferenças na composição de aminoácidos, a atividade de superfície varia entre as proteínas. Em condições similares estão a β -caseína > α -caseína > proteínas do soro. Todas as proteínas solúveis podem ser utilizadas como emulsificantes, embora algumas sejam mais eficientes que outras. Uma característica emulsificante favorável de uma proteína é a facilidade de se abrir na interface.

A proteína adsorvida pode apresentar diversas configurações macromoleculares, variando desde a forma estendida desordenadamente (β -caseína), que se acomoda na interface à proteína compacta globular (β -lactoalbumina), que permanece na sua forma nativa. A extensão da abertura depende da área superficial disponível, do tempo mantido em contato com a interface e da estrutura macromolecular antes da adsorção.

A caseína é a proteína mais utilizada como emulsificante, e a principal fonte é o leite em pó desnatado, ou caseinatos solúveis (sais de sódio ou potássio). É um agregado heterogêneo de proteínas, e o

componente mais importante envolvido na emulsificação é a β -caseína. Por apresentar muitos resíduos de prolina e nenhuma cisteína, a β -caseína é uma proteína flexível, não apresentando ligações intramoleculares. A maior parte da β -caseína adsorvida está diretamente associada com a superfície e com a porção hidrofílica do N - terminal (40 a 50 resíduos predominantemente hidrofílicos) estendida no meio aquoso. A camada espessa da β -caseína adsorvida na superfície contrasta com o filme fino formado pelas proteínas globulares (β -lactoalbumina) adsorvidas na interface da emulsão óleo/água.

A hidrólise enzimática controlada de proteínas geralmente melhora as propriedades de solubilidade e emulsificante, mas a estabilidade da emulsão por longo tempo pode ser comprometida. Por exemplo, as propriedades emulsificantes da proteína de soja glicinina (11S globulina) são melhoradas pela hidrólise triptica, porém os fragmentos de mais baixo PM exibem as piores propriedades emulsificantes.

A instabilidade durante a formação da emulsão ocorre se houver insuficiente surfactante para cobrir inteiramente a interface óleo-água. A floculação e a agregação das gotículas de óleo da emulsão ocorrem em razão da inabilidade do emulsificante adsorvido em prevenir a aproximação das gotículas. As partículas tendem a se agregar devido às forças atrativas interatômicas; no entanto, a agregação é evitada pela interação das cargas repulsivas ou aumentada pela interação das cargas que aparecem a partir do material adsorvido.

A carga líquida da proteína e, conseqüentemente, da camada da proteína adsorvida é altamente dependente do pH: se este se encontra próximo do pI da proteína, a carga líquida se aproxima de zero, favorecendo a agregação das gotículas da emulsão (Figura 4.6). Uma emulsão estável possui carga suficiente para prevenir a aproximação das gotículas suspensas. Um segundo mecanismo da estabilidade aparece a partir da flexibilidade da macromolécula adsorvida estendida a alguns nanômetros dentro da solução, evitando a aproximação das partículas durante a mistura mecânica e os efeitos termodinâmicos.

Proteínas são polímeros carregados, portanto a adsorção às gotículas da emulsão promove ambos os mecanismos de estabilidade. Entretanto, as proteínas, em sua maioria, não são simplesmente homopolímeros, mas possuem diferentes tipos de resíduo de aminoácidos, preferem conformações estáveis em solução e podem adotar

uma conformação fixa na interface da emulsão óleo/água. Algumas proteínas, como a caseína, possuem uma conformação mais móvel.

Durante a adsorção, a proteína muda sua conformação nativa para as formas que dependem das interações hidrofóbicas entre a superfície e o aminoácido presente na cadeia lateral da proteína. Idealmente, as cadeias hidrofóbicas laterais se aproximam da superfície oleosa, e os resíduos hidrofílicos, da fase aquosa. Moléculas de caseína se espalham na interface ou, se suficiente proteína está presente, formam camadas e se estendem além da interface.

Polissacarídios

Os polissacarídios são freqüentemente incorporados a emulsões, com a finalidade de controlar a viscosidade do produto. Entretanto, como não possuem atividade emulsificante, são muito grandes para se acomodarem nos espaços entre as gotículas e, assim, exercer efeito osmótico, puxando a água que se encontra entre as gotículas.

Os biopolímeros são predominantemente hidrofílicos e de alto PM, sendo, portanto, úteis somente para estabilizar emulsão do tipo óleo/água. São denominados hidrocolóides e contribuem para o controle da estabilidade e textura de vários produtos. A maioria são polissacarídios com, relativamente, baixa atividade de superfície na interface da emulsão óleo/água. Isso significa que não ocorre a formação de uma camada adsorvida na superfície. A sua ação se verifica na estabilização da emulsão, pela modificação das propriedades reológicas da fase aquosa contínua.

Diversos hidrocolóides de origem natural são utilizados com sucesso como emulsificantes. Dentre os disponíveis, a goma arábica é a mais utilizada. Ela consiste de uma mistura de polissacarídio ramificado iônico de alto PM com pequenas quantidades de proteínas (~2% p/p). As propriedades emulsificantes e o filme especial formado são derivados da presença dessa fração protéica. Os resíduos da serina e da hidroxiprolina estão envolvidos na ligação co-valente da proteína com o carboidrato, formando o complexo arabinogalactana-proteína.

A atividade superficial da goma arábica é pequena, comparada com a maioria das proteínas. Para compensar esta característica, alta

concentração do emulsificante é utilizada na prática: relação goma: óleo de 1 : 1, em comparação à relação 1 : 10 de proteína-óleo.

Os hidrocolóides que não apresentam proteínas em sua estrutura são as galactomananas: *goma guar* e *locusta*, que possuem também propriedades emulsificantes, se o polissacarídeo apresentar suficientes grupos hidrofóbicos (metil, acetil etc.). Derivados modificados quimicamente, como metil celulose, possuem atividade superficial similar à dos melhores emulsificantes.

Goma arábica: polímero de galactose, arabinose, ramanose, ácido glucurônico

Uso: solúvel em água fria, baixa viscosidade, não gelifica; estabilizante de emulsões.

Goma guar: Galactomanana

Uso: hidratável a frio, formando solução viscosa entre pH 4 e 10; não gelifica; espessante e estabilizante.

Locusta: Galactomanana

Uso: solúvel em água quente, viscosa entre pH 3 e 11; não gelifica. Estabilizante de emulsões, espessante.

Emulsificação

Os biopolímeros que possuem quantidades significativas de grupos polares e apolares tendem a ser ativos de superfície. Quando o biopolímero está disperso na fase aquosa, alguns grupos não-polares ficam em contato com a água, situação esta termodinamicamente desfavorável devido às interações hidrofóbicas. Quando da adsorção na interface, ocorre alteração na sua conformação de modo que grupos não-polares se encontram localizados na fase oleosa e grupos hidrofílicos, na fase aquosa. A adsorção também reduz a área de contato entre as moléculas de óleo e de água na interface óleo-água, diminuindo a tensão superficial. Ambos os fatores favorecem a adsorção da molécula anfifílica na interface.

A conformação que o biopolímero adota na interface e as propriedades físico-químicas da membrana formada dependem da estrutura molecular e da interação. Os biopolímeros flexíveis adotam uma conformação de forma que os segmentos não-polares, predominate-

suficientemente eficazes para prevenir que as gotículas se aproximem, evitando a coalescência. Se a membrana formada é suficientemente espessa, as forças repulsivas podem também prevenir a floculação via repulsão eletrostática.

As propriedades da emulsão estabilizada por biopolímeros carregados são sensíveis ao pH e à força iônica. Em valores de pH próximo ao ponto isoelétrico da proteína ou em força iônica elevada, a repulsão eletrostática entre as gotículas não é suficiente para prevenir a sua agregação (Figura 4.6). Uma grande variedade de proteínas é utilizada como emulsificante em alimentos, pois estas possuem elevadas proporções de grupos não-polares, sendo, portanto, ativas na superfície.

Os polissacarídios, em sua maioria, são predominantemente hidrofílicos e, portanto, não-ativos na superfície. Entretanto, alguns apresentam caráter hidrofóbico (goma arábica) ou que tenha sido modificado quimicamente pela introdução de grupos não-polares (amido modificado), podendo, então, ser utilizado como emulsificante. Uma segunda finalidade da utilização dos biopolímeros em emulsão é aumentar a viscosidade da fase aquosa.

São utilizados aqueles que possuem a seguinte característica: *alta capacidade de hidratação e moléculas estendidas*. A habilidade para aumentar a viscosidade da solução é dependente do seu peso molecular, do grau de ramificação, da sua conformação e flexibilidade. Ambos, proteínas e polissacarídios, podem ser utilizados como agentes espessantes, mas os polissacarídios são geralmente preferidos, pois tendem a ter peso molecular elevado e são mais estendidos; portanto, podem ser utilizados em concentração muito baixa.

A conformação e a orientação das moléculas na interface são governadas pela tentativa de se reduzir a energia livre do sistema. As moléculas anfifílicas organizam-se de forma que o maior número de grupos não-polares esteja em contato com a fase oleosa, enquanto o máximo de grupos polares esteja em contato com a água. Por essa razão, os emulsificantes de baixo PM tendem a manter seus grupos polares direcionados para o contato com a fase aquosa; e sua cadeia de hidrocarbonetos, para a fase oleosa. De forma similar, os biopolímeros também possuem o mesmo comportamento. Frequentemente, os biopolímeros alteram o arranjo de suas estruturas após a adsorção na interface, maximizando o número de interações favoráveis. Em solução

aquosa, as proteínas globulares adotam conformação tridimensional, de forma que os aminoácidos não-polares estejam predominantemente localizados no interior hidrofóbico da molécula, mantendo-se distantes da água (Figura 4.18).

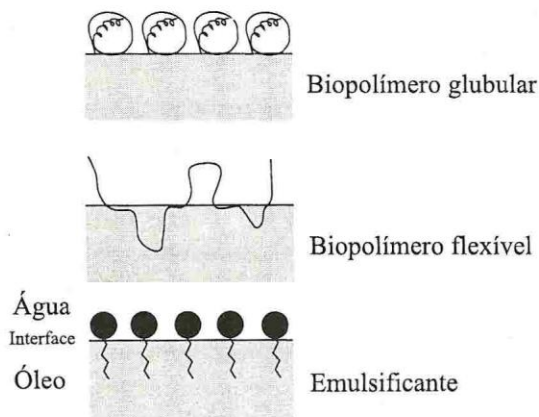


Figura 4.18 - Orientação e conformação das moléculas na interface.

As proteínas utilizadas como emulsificantes protegem as gotículas da coalescência. As principais razões são: *produzem emulsões de gotículas de pequeno tamanho, oferecem forças repulsivas fortes entre as gotículas (combinação de interações eletrostática e estéricas), apresentam tensão superficial elevada e formam membranas altamente viscoelásticas*. As proteínas hidrolisadas são menos efetivas na prevenção da coalescência devido à tendência de se formarem camadas interfaciais muito finas e menos viscoelásticas, portanto facilmente rompidas. A coalescência de emulsões estabilizadas pelos emulsificantes de baixo PM é determinada por sua habilidade de manter as gotículas separadas e não de oferecer resistência à ruptura da membrana das gotículas.

Inversão de fases

A inversão de fase é o processo em que ocorre a mudança no tipo de emulsão óleo/água para água/óleo ou vice-versa. Esta inversão é um estágio essencial na fabricação de importantes produtos, incluindo a manteiga e margarina. Geralmente é causada por alguma alteração na

composição ou nas condições da emulsão (agitação mecânica, temperatura, concentração e tipo do emulsificante). Somente em certos tipos de emulsão é possível ocorrer a inversão de fase. As bases físico-químicas são extremamente complexas, envolvendo aspectos de floculação, coalescência e formação de emulsão. Convenientemente, a inversão de fase pode ser dividida em duas categorias conforme a sua origem:

Na fabricação de manteiga, o creme utilizado possui em torno de 30% de gordura. A fase gordurosa encontra-se dispersa na forma de glóbulos no soro (O/A). Cada glóbulo de gordura é envolvido por uma membrana que funciona como emulsificante. Esta, como em todas as membranas biológicas, possui lipídios e proteínas denominadas de lipoproteínas. A estabilidade da membrana depende da estrutura lipofílica/hidrofílica, de forma que os grupos polares se posicionam em lado oposto aos grupos hidrofóbicos.

Quando o creme é agitado, a camada de lipoproteína é rompida e o balanço hidrofóbico/hidrofílico fica comprometido, ocorrendo então a coalescência dos glóbulos de gordura. Nesta situação, os fosfolipídios tornam-se o principal emulsificante. A maior parte da água encontra-se na forma de soro, mas o que permanece (~18%) na mistura gordura/água é aprisionada na forma de emulsão (A/O) denominada manteiga. Esta nova situação é denominada inversão de fase.

Inversão de fase induzida pelo emulsificante – Ocorre em emulsões estabilizadas por emulsificantes de baixo PM, sendo provocada por alterações da geometria molecular das moléculas do emulsificante. Uma emulsão estabilizada por um emulsificante não-iônico passa da emulsão do tipo óleo/água para um sistema bicontínuo água/óleo com o aquecimento, em razão da desidratação progressiva dos grupos polares. Este processo é caracterizado como inversão de fase pela temperatura, governada pela geometria molecular do emulsificante.

Emulsão do tipo óleo/água estabilizada por emulsificantes iônicos exibe comportamento similar quando a concentração de eletrólitos na fase aquosa aumenta. Este tipo é reversível, pois, quando a emulsão é resfriada ou a força iônica diminui, a emulsão água/óleo reverte-se para óleo/água. É necessária agitação contínua durante este processo; caso contrário, ocorrerá separação de fases. O principal fator determinante desta inversão é a geometria molecular do emulsificante e de sua dependência das condições do meio.

Inversão de fase induzida pela cristalização da gordura – Quando uma emulsão do tipo óleo/água contendo gotículas na forma líquida é congelada na temperatura em que estas são parcialmente cristalizadas, ocorre a inversão de fase para água/óleo. A principal causa é a coalescência parcial das gotículas, que provocam a formação de uma malha de cristais de gordura retendo água. Esse é o principal estágio na produção de manteiga e margarina.

Quando a emulsão é aquecida em uma temperatura de forma que os cristais de gordura se fundem, a emulsão se rompe devido à liberação das gotículas de água anteriormente retida, ocorrendo a separação de fases. Isso pode ser observado quando se funde a margarina ou a manteiga posteriormente resfriada para a sua temperatura original. Esse tipo de inversão de fase depende principalmente da cristalização da gordura e da resistência das gotículas à coalescência.

Oxidação da Emulsão

Oxidação de lipídios é um termo genérico utilizado para descrever uma sequência complexa de alterações químicas, resultante da interação do lipídio com as espécies ativas oriundas do oxigênio (peróxido de hidrogênio, radical hidroxil e peroxil). É a principal causa da deterioração da qualidade das emulsões, existindo diferenças significativas entre a oxidação em óleos e gorduras e os lipídios emulsionados.

Considerando os dois tipos de emulsão: A/O e O/A, a oxidação da fração lipídica na emulsão tipo A/O ocorre de forma similar aos óleos e gorduras pelo fato de a exposição da superfície da fração lipídica estar diretamente em contato com o oxigênio. A instabilidade oxidativa da emulsão tipo O/A origina-se da interação entre o peróxido localizado na superfície das gotículas e os metais de transição (Fe^{++} e Cu^{++}) presentes na fase aquosa, capazes de promover a sua decomposição em radicais peroxil e alcóxil altamente reativos, acelerando a reação de oxidação do lipídio na emulsão.

Os peróxidos presentes nas gotículas da emulsão são moléculas ativas de superfície, na qual, portanto, acumulam-se, enquanto as diversas espécies moleculares responsáveis em acelerar a oxidação originam-se da fase aquosa. O aumento da velocidade da reação requer que os pró-oxidantes estejam em contato com a fração lipídica na superfície das gotículas, o que depende das características moleculares das várias

espécies reativas envolvidas. Uma vez formado, os radicais livres na superfície são capazes de interagir com os lipídios nas imediações ou no interior das gotículas; portanto, a velocidade da reação de oxidação em emulsão é limitada pela difusão dos radicais livres, peróxidos ou do lipídio de uma região para outra dentro das gotículas. A formação e a decomposição do radical alcóxil resultam em diferentes moléculas, incluindo aldeídos, cetonas, álcoois e hidrocarbonetos, responsáveis pelas propriedades sensoriais do óleo oxidado.

Conceitualmente, a emulsão divide-se em três regiões distintas: interior das gotículas, fase contínua e região interfacial (Figura 4.2). A região interfacial consiste de uma pequena membrana que envolve cada gotícula da emulsão, constituindo-se principalmente de moléculas ativas de superfície. A natureza dessa membrana tem importante implicação no processo de oxidação de lipídios. Outro fator importante é a orientação das moléculas de lipídios na região interfacial, ou seja, se estão paralelas ou perpendiculares à interface. Esta situação afeta o acesso das espécies reativas oriundas do oxigênio.

Quando o emulsificante é utilizado para estabilizar a emulsão, somente uma fração deste envolve as gotículas prevenindo da coalescência, enquanto o restante permanece na fase aquosa. As várias moléculas presentes na emulsão particionam entre as três diferentes regiões de acordo com a sua polaridade e atividade de superfície. As moléculas não-polares localizam-se predominantemente na fase oleosa, as moléculas polares, na fase aquosa e as anfifílicas, na interface.

Fatores que influenciam a oxidação de lipídios em emulsão

1) *Emulsificante e pH da emulsão* – Os emulsificantes afetam a oxidação de lipídios de diferentes modos, por exemplo, influenciando a espessura da interface. As proteínas são os emulsificantes preferidos para a emulsão tipo O/A pela sua resistência superior à coalescência. Não podem ser utilizadas para a emulsão tipo A/O devido à insolubilidade no óleo. As emulsões estabilizadas por proteínas o pH deverá estar abaixo ou acima do pI da proteína para se evitar a coalescência das gotículas. Portanto, as gotículas emulsificadas podem apresentar cargas positivas ou negativas na superfície.

As cargas da superfície das gotículas de uma emulsão são importantes na oxidação de lipídios catalisados por traços de íons metálicos, como o Fe^{++} . Superfície com cargas negativas, as gotículas da emulsão atraem os metais prooxidantes carregados positivamente trazendo-os para a proximidade dos ácidos graxos insaturados, portanto acelerando a oxidação. É importante levar em consideração que a solubilidade dos metais aumenta com a diminuição do pH, aumentando potencialmente a oxidação.

2) *Estrutura química dos lipídios* – A estrutura química da molécula do lipídio que determina sua sensibilidade à oxidação resume-se ao número e à localização da insaturação. A utilização de fontes de lipídios contendo pouco ou nenhum ácido graxo insaturado seria a estratégia a ser utilizada para retardar a oxidação de lipídio. Na prática, este procedimento seria impossível.

3) *Concentração de oxigênio* – A oxidação de lipídios envolve a reação entre o ácido graxo insaturado e o oxigênio. Sendo o oxigênio três vezes mais solúvel em óleo que em água (0,6 mM e 0,2 mM, respectivamente), quantidade suficiente está presente na fase oleosa. A utilização de embalagem a vácuo ou a nitrogênio retarda o processo oxidativo de um produto, que se torna sensível após aberta a embalagem. Portanto, a sua exclusão (embalagem a vácuo ou a nitrogênio) da fase aquosa certamente controla a difusão para a fase lipídica.

4) *Antioxidantes* – A questão da partição do antioxidante em diferentes fases da emulsão é fundamental para a sua ação. Os antioxidantes polares são mais ativos em meio não-polar, como óleo, que os não-polares. Isto se deve ao fato de que os antioxidantes polares se localizam na interface ar/óleo, onde ocorre ou se inicia a oxidação. Por outro lado, os antioxidantes lipofílicos são ativos em sistema polar, como emulsão do tipo O/A, em razão da sua característica não-polar localizando na fase oleosa, onde a oxidação se propaga.

Na emulsão O/A, as gotículas de óleo são revestidas pela interface, não estando, portanto em contato direto com o ar e, ou, água. A oxidação de lipídios é um fenômeno interfacial. Em óleos, as reações de oxidação ocorrem na interface entre o óleo e ar, no espaço livre acima ou na interface entre o óleo e o ar dissolvido. Em geral, a velocidade das reações de oxidação é mais rápida em emulsões que em óleos, em razão da elevada área superficial presente na emulsão, comparada com a relativamente pequena interface entre o ar e o óleo. Outros fatores, como

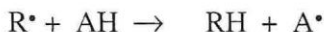
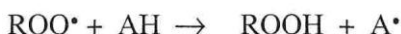
a espessura da interface, cargas presentes e capacidade de complexação de metais pelo emulsificante, são significantes para a oxidação.

Em emulsão tipo O/A, a concentração de prooxidantes é elevada na fase aquosa, portanto a oxidação pode então ser iniciada nesta fase ou na interface em vez de ocorrer da fase oleosa. Portanto, o oxigênio, os metais prooxidantes e antioxidantes solúveis em água necessitam se difundir através da fase aquosa antes de atingir as gotículas de óleo ou a interface da emulsão.

O processo mais efetivo para retardar a oxidação de lipídios é a incorporação de antioxidantes, que funcionam por diferentes mecanismos, incluindo o controle da oxidação dos substratos (oxigênio e lipídios), controle dos prooxidantes (espécies reativas oriundas do oxigênio e metais) e inativação de radicais livres (Capítulo 2).

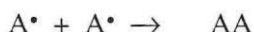
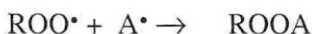
- *Antioxidantes primários*: São capazes de remover os radicais livres bloqueando a reação inicial e, portanto, interromper a reação de propagação. Apresentam maior afinidade pelos radicais peroxilas que os lipídios, convertendo-os em radicais mais estáveis ou em não- radicais (eq. 4.5).

eq. 4.5



O radical antioxidante (A.) produzido neste processo é muito menos reativo que o radical peroxil, portanto menos eficiente para promover a oxidação. Os antioxidantes primários são também capazes de terminar a reação de oxidação reagindo com os radicais peroxil e alcóxil, e entre outros (eq. 4.6).

eq. 4.6



Os antioxidantes normalmente utilizados em óleos/gorduras são também eficazes para emulsões. Entretanto, sua eficiência é

consideravelmente distinta, o que é atribuído a afinidades diferenciadas na interface *ar/óleo* ou *água/óleo*. Os antioxidantes polares são mais eficientes em óleos/gorduras pela formação de uma membrana protetora na interface *ar/óleo*, reduzindo o acesso do substrato lipídico ao oxigênio.

Em contraste, os antioxidantes não-polares são mais eficazes em emulsão em razão de sua retenção pelas gotículas de óleo que se acumulam na interface óleo/água, local onde os peróxidos presentes na superfície e os prooxidantes oriundos da fase aquosa ocorrem. Pela mesma razão, a eficiência dos antioxidantes primários em retardar a oxidação de lipídios em emulsão do tipo O/A aumenta com a diminuição de sua polaridade ou com aumento da atividade de superfície, pois se localiza na interface óleo/água, onde ocorrem as reações, devendo, portanto, os antioxidantes anfifílicos ser mais eficientes.

- *Antioxidantes secundários*: Retardam a oxidação de lipídios por vários mecanismos, entre eles a complexação com metais, regeneração dos antioxidantes primários doando hidrogênio, remoção do oxigênio e desativação das espécies reativas. Do ponto de vista da emulsão O/A, os tipos mais importantes são aqueles capazes de complexar com metais.

A presença de metais de transição, como o ferro e cobre, na fase aquosa da emulsão é o principal fator na promoção da oxidação. Os mais utilizados são o EDTA, ácido fosfórico e os polifosfatos, os quais se ligam fortemente aos minerais, tornando-os não-disponíveis tanto para catalisar as reações de oxidações quanto para o organismo. O ácido cítrico pode também ser utilizado, mas é menos eficiente, além de ter limitado uso em diversos alimentos em razão de seu *flavor*, solubilidade e, ou, requerimento de meio ácido (Capítulo 2).

A eficiência do antioxidante em emulsão é diferente quando comparado a óleos/gorduras. Essa diferença é atribuída à afinidade com a interface *ar/óleo* ou *água/óleo*. Os antioxidantes polares, devido à formação de uma membrana de proteção na interface *ar/óleo*, reduzem o acesso do lipídico ao oxigênio. Em contraste, os antioxidantes não-polares são mais efetivos em emulsões, em razão da formação de uma membrana de proteção que envolve as gotículas.

As células vivas freqüentemente utilizam a mistura sinérgica de antioxidante polar e não-polar, e o mais importante par hidrofóbico-hidrofílico descrito na literatura consiste de α -tocoferol e ácido ascórbico. A vitamina E localizada na membrana celular atua removendo os radicais

livres, e cada molécula é capaz de remover dois radicais, sendo posteriormente regenerada pela vitamina C (Figura 3.8).

5) *Interação com os componentes da fase aquosa* – As emulsões apresentam diversos ingredientes na fase aquosa que podem influenciar nas reações de oxidação, como as proteínas, açúcares, ácidos, bases, tampões, sais, polissacarídios e emulsificantes. Estes atuam como antioxidantes ou proantioxidantes, dependendo de suas propriedades químicas.

- Sais: O efeito antioxidante do sal é provavelmente devido a sua habilidade de reduzir a tendência das espécies carregadas de se acumularem na interface das gotículas, interagindo eletrostaticamente com estas; já o seu efeito prooxidante deve-se provavelmente ao fato de aumentar o efeito catalítico dos íons presentes.

- Açúcares: Os açúcares não-redutores, como a sacarose, diminuem a concentração do oxigênio dissolvido e aumentam a viscosidade da fase aquosa (diminuindo a difusão das espécies reativas), além de atuarem na remoção de radicais livres. Os açúcares redutores promovem a oxidação, reduzindo os metais de transição para o estado mais ativo ($\text{Fe}^{+++} \rightarrow \text{Fe}^{++}$). Este efeito pode também ser observado em qualquer outro componente redutor presente na emulsão como a glutatona, ascorbato e tocoferol.

- Polissacarídios: A adição de polissacarídios em emulsão do tipo O/A, além de aumentar a viscosidade da fase aquosa, melhora a textura e estabiliza as gotículas evitando a coalescência. O mecanismo de proteção da oxidação de lipídios provavelmente ocorre pela complexação com os metais.

- Proteínas: As proteínas são frequentemente utilizadas para estabilizar as gotículas da floculação ou coalescência. Em vários tipos de emulsão, quantidades apreciáveis de proteínas não são adsorvidas e, portanto, dispersam na fase aquosa, podendo aumentar ou diminuir a estabilidade oxidativa da emulsão por diversos mecanismos: enzimático e não-enzimático, complexação de metais, remoção de radicais livres e catalisação de reações específicas.

- Emulsificante: A sensibilidade do emulsificante contendo hidrocarboneto insaturado à oxidação lipídica depende de a cadeia estar perpendicular ou paralela às gotículas da superfície; neste último caso há maior tendência à oxidação pelos radicais livres gerados na fase aquosa.

Esta pode promover a instabilidade física de algumas emulsões. Por exemplo, vários produtos oriundos da oxidação são ativos de superfície e, portanto, podem interagir com a membrana interfacial que envolve as gotículas, provocando a coalescência. Estratégias para retardar a oxidação de lipídios em emulsão envolvem a incorporação de antioxidantes e o controle das condições de armazenamento.

Os emulsificantes utilizados em emulsão tipo O/A previnem a coalescência ou floculação, pela formação de uma membrana protetora em volta das gotículas. Após a homogeneização, quantidade significativa do emulsificante não-adsorvido estará presente na fase aquosa da emulsão, formando micelas capazes de incorporar as moléculas não-polares e polares que alteram a estabilidade oxidativa do sistema.

- Ácido, base e tampão: São utilizados no controle do pH da emulsão com efeitos na estabilidade, reologia e no *flavor* do produto. O pH da fase aquosa influencia a estabilidade oxidativa da emulsão do tipo O/A de diversas maneiras, em razão do seu efeito sobre a reatividade e solubilidade das espécies reativas envolvidas no processo.

A natureza da membrana que envolve as gotículas é importante no processo da oxidação de lipídios e ocorre de forma similar, conforme descrito no Capítulo 1, em emulsão do tipo A/O; porém isso não ocorre no tipo O/A. As gotículas de emulsões são envolvidas por uma *membrana* de moléculas de emulsificante, que previne a sua coalescência.

Em alimentos, esta membrana geralmente consiste de pequenas moléculas de surfactantes ou proteínas e, ou, combinações. Além de aumentar a estabilidade física da emulsão, essa membrana protege os lipídios da oxidação, atuando como barreira à difusão e penetração de espécies moleculares capazes de iniciar a oxidação no interior das gotículas.

A homogeneização protege o leite da oxidação catalisada por complexos de metais. Em leite cru, a membrana que envolve as gotículas de gordura consiste de lipoproteínas e pequenas quantidades de fosfolipídios, esteróis e enzimas. A homogeneização aumenta a área interfacial e altera a composição da membrana das gotículas. A caseína, que se encontrava originalmente dispersa na fase aquosa, é adsorvida na superfície das gotículas, formando uma camada de proteção e aumentando a estabilidade oxidativa.

Interação do Emulsificante com Proteínas e Amido

As proteínas do trigo são consideradas, em razão de sua habilidade em formar massa viscoelástica, a única com essa propriedade. Quando a mistura de farinha de trigo com água (3:1) é movimentada, resulta na formação de uma massa com propriedade viscoelástica própria para a fabricação de pão e de outros produtos de panificação. Esta característica é atribuída às proteínas do trigo. A fração protéica presente na farinha apresenta duas frações: *solúvel* e *insolúvel*. As proteínas solúveis representam 20% do total, sendo constituídas principalmente de *albumina* e *globulina*. Estas não contribuem para a formação da massa.

A principal proteína de reserva do trigo é o glúten, constituído de uma mistura heterogênea de proteínas, principalmente *gliadinas* e *gluteninas*, com solubilidade limitada em água. A formação da capacidade viscoelástica da massa capaz de reter o gás durante a fermentação é atribuída às proteínas do glúten. Aproximadamente 30% da composição em aminoácido é de hidrofóbicos, contribuindo para a formação de agregados de proteína através de interações hidrofóbicas e de interação com lipídios e outras moléculas não-polares. Os aminoácidos cisteína e cistina (2-3% do total de aminoácido do glúten), durante a formação da massa, promovem a polimerização das proteínas do glúten, por meio da formação de pontes de enxofre.

Diversas transformações químicas e físicas ocorrem durante a movimentação da mistura farinha de trigo e água. Nesta etapa, as proteínas do glúten absorvem água e se torna parcialmente estendida, facilitando as interações hidrofóbicas e reação de formação de pontes de enxofre, resultando na formação de polímeros lineares. As interações entre estes polímeros ocorrem via pontes de hidrogênio, associação hidrofóbica e pontes de enxofre formando filmes capazes de reter o gás. Em razão destas transformações ocorridas no glúten, a resistência da massa aumenta com o tempo até certos limites seguido de rompimento da estrutura. O tempo necessário para se atingir a força máxima da massa durante a movimentação, está relacionada com a qualidade da farinha: maior tempo e melhor qualidade.

A presença de pontes de enxofre nas proteínas do trigo forma uma malha (Figura 4.19), e a estrutura do glúten se torna mais forte quanto mais

pontes de enxofre estiverem presentes. Agentes oxidantes, como bromato ou deidroácido ascórbico, aumentam a força do glúten, por meio da oxidação de grupos sulfidríla ($-SH$), aumentando o número de pontes de enxofre intermolecular ($-S-S-$). Estas ligações cruzadas permitem às proteínas do glúten a formação de redes de proteínas, resultando na melhoria da elasticidade da massa e da característica final do produto.

Alguns tipos de emulsificantes (estearoil-2-lactilato e derivados de monoglicerídeos e polissorbatos) são capazes de interagir com as gluteninas, gliadinas e lipídios polares da farinha, aumentando, assim, o número de interações na rede, o que a torna mais flexível e resistente e melhora a retenção do CO_2 e a elasticidade.

O mecanismo exato desta interação ainda não é claramente compreendido, mas provavelmente envolve interações hidrofílicas e hidrofóbicas do emulsificante com as proteínas durante a movimentação da massa. Com o aquecimento, ocorre a desnaturação da proteína e as moléculas do emulsificante são translocadas e se ligam às moléculas do amido gelatinizado, formando o complexo proteína-lipídio-amido.

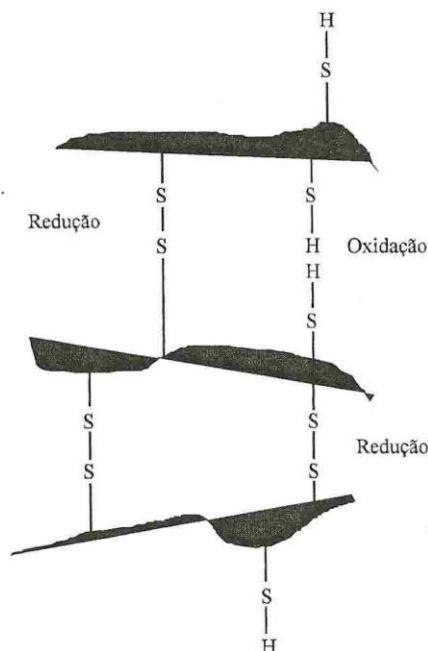


Figura 4.19 - Esquema da malha do glúten e modificações químicas.

As propriedades da massa (retenção de gás, estrutura e vida útil) podem ser melhoradas com a adição de emulsificantes sintéticos (Tabela 3.6). Os emulsificantes com BHL entre 9 e 11 são mais efetivos. O seu efeito está relacionado com a interação com o complexo amido-proteína-gordura-água. A base molecular desta interação não está perfeitamente esclarecida.

Tabela 3.6 - Efeito do emulsificante na qualidade do pão

Emulsificante	Volume	Vida útil	Qualidade
Éster de sorbitana	Muito bom	S/efeito	Bom
Estearoil-2-lactil cálcio	Muito bom	Bom	Muito bom
Lactato de monoestearato	Bom	Bom	Muito bom
Monoglicerídio succinilato	Muito bom	Muito bom	Muito bom
Mono e diglicerídio etoxilado	Muito bom	S/efeito	Razoável
Estearoil lactilato de sódio	Muito bom	Bom	Muito bom

O amido gelatinizado, seja total ou parcial, forma uma pasta, e, à medida que esta se resfria, o gel é formado. Nesta situação, pequenas quantidades de sólido mantêm imobilizada uma grande quantidade de água. Com o resfriamento do gel, as moléculas de amilose se atraem, expulsando a água, quando, então, ocorre a compactação. Esse fenômeno de recristalização das cadeias do amido é denominado retrogradação e é irreversível, sendo o responsável direto pelo endurecimento de produtos à base de amido.

A interação do emulsificante com a amilose formando complexos helicoidais insolúveis é função importante em vários produtos industrializados à base de amido. Dentre os emulsificantes comerciais disponíveis, o monoglicerídio saturado destilado possui o mais alto índice de complexação, seguido do estearoilactilato; no outro extremo, a lecitina. O fator mais relevante na formação do complexo helicoidal com a amilose é a configuração química do emulsificante, de modo a permitir o perfeito encaixe na dimensão da hélice da amilose formada ao redor do agente complexante.

O monoglicerídeo contendo ácido graxo saturado é mais efetivo que o insaturado, provavelmente em razão da forma não-linear da cadeia de hidrocarboneto do ácido graxo insaturado, em comparação com a cadeia linear do saturado (Figura 4.2). A cadeia linear da amilose se dobra, formando hélices com o emulsificante, à semelhança do iodo. Os grupos *C-H* e o *oxigênio glicosídico* orientam-se para dentro da hélice, formando uma camada hidrofóbica, com os grupos hidrofílicos (OH) voltados para fora. O complexo formado é insolúvel em água, o que afeta a mobilidade da amilose durante o processamento térmico, reduzindo a retrogradação.

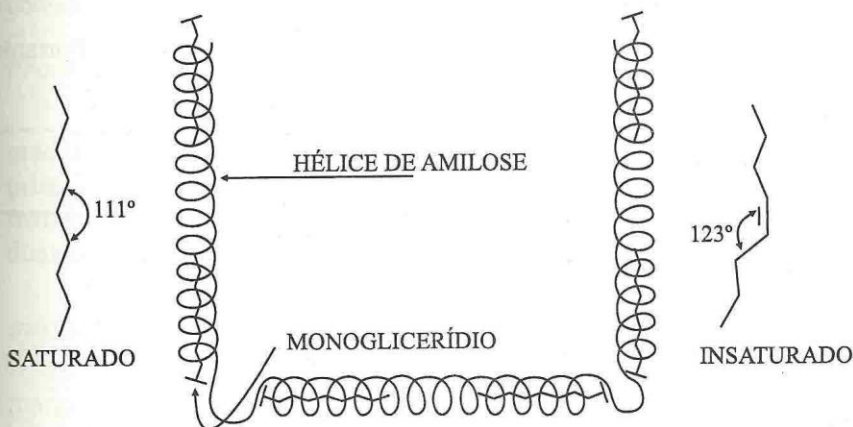


Figura 4.2 - Complexo da amilose com monopalmitoilglicerol.

Determinação do Tipo de Emulsão

1 - Emulsão é um sistema que consiste de uma, ou mais, fase dispersada ou descontínua em uma fase contínua. Em alimentos, a fase contínua é geralmente água ou óleo comestível. A classificação com base no estado físico das partículas compreende: *dispersão* (sólido dispersado em líquido), *emulsão* (líquido disperso em líquido) e *espuma* (gás disperso em líquido). A emulsão e a espuma podem ser estabilizadas na presença de emulsificantes, os quais diminuem a tensão superficial, por intermédio de aditivos, os quais aumentam a viscosidade da fase contínua.

Procedimento

- Colorir o óleo com o corante (vermelho Sudan III).
- Misturar o emulsificante com o líquido especificado na tabela abaixo.
- Colocar óleo e água no misturador (elétrico) e agitar por 30 segundos.
- Transferir para o béquer e observar.
- Observar a emulsão no microscópio (lâmina), para determinar se ela é do tipo O/A ou A/O.

Obs. *Vermelho Sudan III* é solúvel em óleo e insolúvel em água. Portanto, a coloração não se espalha além dos glóbulos de óleo.

Emulsificante	Óleo (ml)	Água (ml)	Dissolver o Emulsificante
<i>Emulsão óleo/água</i>			
1 - Controle (sem emulsificante)	10	40	-
2 - Lecitina - 0,5 g	10	40	Óleo
3 - Clara de ovo - 0,5 ml	10	40	Água
4 - Tween 40 - 0,5 g	10	40	Óleo
5 - Detergente 0,5 ml	10	40	Água
<i>Emulsão água/óleo</i>			
1 - Controle (sem emulsificante)	40	10	-
2 - Lecitina - 0,5 g	40	10	Óleo
3 - Clara de ovo - 0,5 ml	40	10	Água
4 - Tween 40 - 0,5 g	40	10	Óleo
5 - Detergente - 0,5 ml	40	10	Água

2 - As margarinas, muito utilizadas como substituto da manteiga, contêm gorduras vegetais hidrogenadas. Por regulamentação, a margarina comum contém 80% de gordura e a dietética, entre 39 a 41%. Portanto, a diferença fundamental entre a margarina *light* e a normal está no conteúdo de gordura e de água. A emulsão A/O é estabilizada pela

mistura de mono e diglicerídios (~0,5%) e lecitina (~0,25%). A fase aquosa da margarina possui pH entre 4,2 e 4,5 pela adição de ácido cítrico e láctico. Além de afetar o sabor e aroma, esses acidulantes protegem da degradação microbiológica e complexam metais.

No caso da maionese, a emulsão é do tipo O/A contendo entre 50 e 85% de óleo comestível, 5 e 10% de gema de ovo, vinagre, sal e temperos. A emulsão formada é estabilizada pelos fosfolipídios presentes na gema. No caso de uma maionese com baixo teor de óleo (< 50%), é necessária a adição de espessantes como amido, pectina, ágar-ágar, alginatos, carboximetilcelulose, proteína de leite ou gelatina. Como conservantes, são utilizados os ácidos sórbico, benzóico e paraben.

Procedimento

Dissolver a margarina em estufa e colocar em uma proveta graduada 20 mL de margarina *light* e, em outra proveta, idêntica à primeira, a mesma quantidade de margarina comum; aquecer em banho-maria as duas provetas contendo as margarinas até o aparecimento de duas fases. Em seguida:

- 1 - reproduzir as figuras obtidas (provetas) após o aquecimento das margarinas, identificando as duas fases;
- 2 - verificar visualmente o conteúdo de água nos dois tipos de margarinas; e
- 3 - verificar no rótulo os aditivos presentes, explicando a razão de sua utilização.

EXERCÍCIOS

- 1) Verificar como o tipo de emulsificante afeta a formação e estabilidade das emulsões A/O e O/A.
- 2) Quais propriedades químicas devem ter um bom emulsificante?
- 3) Qual é o tipo de emulsão em creme, margarina, manteiga, molho para salada e leite?
- 4) Que tipo de emulsificante (baixo ou alto BHL) deve ser selecionado para a fabricação de margarina e de molho para salada?
- 5) Por que os detergentes são ótimos agentes de limpeza?

ÓLEOS ESSENCIAIS

Introdução

Os óleos essenciais são geralmente uma mistura complexa de *hidrocarbonetos*, *álcoois* e *compostos carbonílicos*. Os hidrocarbonetos mais freqüentemente encontrados pertencem a grupos de substâncias conhecidas como *terpenos* e, em menor freqüência, *sesquiterpenos*. Ocorrem em todo tecido vivo de planta, geralmente concentrados na casca, nas flores, no rizoma e nas sementes.

Estes óleos não apresentam nenhuma relação com os óleos comestíveis, uma vez que não são ésteres de glicerol. São inflamáveis e solúveis em álcool e éter, mas insolúveis em água. A sua utilização na indústria de processamento de alimentos continua crescendo, em substituição aos condimentos na forma natural, em virtude de sua uniformidade, estabilidade e higiene.

As reações químicas e bioquímicas responsáveis pelas características do aroma no alimento são muito complexas. Existem aproximadamente 4.000 tipos de substâncias voláteis já identificadas oriundas de diferentes vias metabólicas, dos quais apenas alguns são conhecidos. Além do mais, a relação entre a estrutura química e a atividade desses compostos permanece ainda desconhecida.

Extração de Óleos Essenciais

Podem-se obter os óleos essenciais a partir do tecido vegetal, por arraste com vapor. O extrato bruto obtido é extraído diversas vezes com

solventes orgânicos, os quais são posteriormente removidos, o que resulta em um produto final constituído de voláteis e material resinoso não-volátil contendo o princípio ativo característico.

A extração pode ser realizada mecanicamente ou por procedimentos de destilação. Como diversos constituintes são termolábeis, sensíveis a ácidos ou facilmente hidrolisados, a composição e a qualidade do produto dependem do procedimento de isolamento.

Os componentes individuais podem ser separados do extrato bruto, por meio da destilação fracionada a pressão reduzida, cristalização ou cromatografia. A pressão e a temperatura utilizadas no processo são selecionadas de forma a evitar, ao máximo, perdas de substâncias aromáticas provocadas pela decomposição térmica, oxidação ou hidrólise.

Quando o teor de óleo essencial na amostra é baixo, os constituintes aromáticos podem ser destruídos durante a destilação ou solubilizados em água, ao passo que o óleo pode ser recuperado por meio do processo de extração.

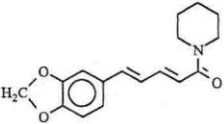
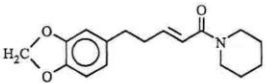
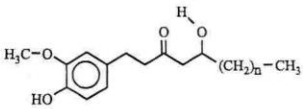
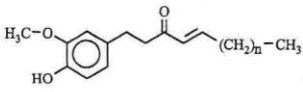
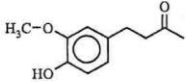
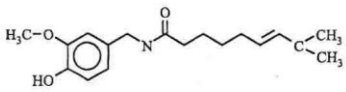
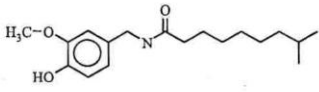
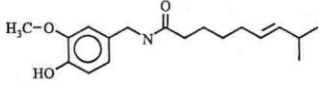
Os solventes comumente utilizados são *hexano*, *cloreto de metileno*, *acetona*, *etanol*, *água*, *óleos vegetais* e *CO₂ líquido* (Capítulo 18). Os solventes são posteriormente removidos por destilação, e o extrato bruto contém, além do óleo essencial, lipídios, ceras, pigmentos e outras substâncias extraídas.

A utilização de condimentos na forma de pó apresenta certas dificuldades tecnológicas em razão de sua curta "vida de prateleira", da perda do aroma e da contagem bacteriana elevada, acelerando a contaminação microbiológica em produtos processados. Com a utilização do extrato, esses problemas são contornados e a qualidade do produto final (*extrato*) depende do solvente utilizado e da matéria-prima. O *flavor* pungente característico de condimentos como pimenta, páprica e gengibre (Tabela 5.1) é derivado de substâncias não-voláteis. A concentração de *capsaicina* na pimenta-vermelha depende de fatores como variedade, local e época de cultivo, secagem e condições de armazenamento variando de 0,075-0,8%.

Alguns terpenos, como o hidrocarboneto *limoneno* (Figura 5.1), são encontrados em diferentes espécies vegetais, enquanto outros, principalmente aldeídos aromáticos e fenóis, ocorrem como principais constituintes em algumas plantas. O aroma característico do óleo de cravo, por exemplo, é devido principalmente ao *eugenol*. Entretanto, o

aroma completo de uma especiaria geralmente depende da mistura de diversas substâncias, não sendo reproduzido por um simples componente.

Tabela 5.1 - Substâncias pungentes em condimentos

Nome	Estrutura	Ocorrência	Pungência relativa*
Piperina		Pimenta-preta	1,0
Piperanina		Pimenta-preta	0,5
Gingerol		Gengibre	0,8
Shogaol		GENGIBRE	1,6
ZINGERONA		Gengibre	0,2
Capsaicina		Capsicum	280
Deidro-capsaicina		Capsicum	280
Nordeidro-capsaicina		Capsicum	210

* Referência: Pungência da piperina = 1,0.

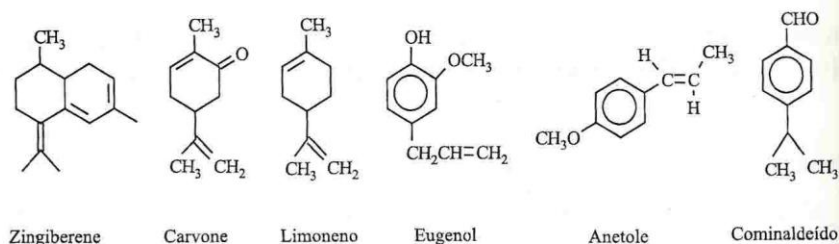


Figura 5.1 - Alguns flavorizantes presentes no óleo vegetal.

Características dos Óleos Essenciais

A grande maioria dos óleos essenciais de interesse comercial é uma mistura de hidrocarbonetos monoterpenos e sesquiterpenos. Um segundo componente presente em concentração elevada consiste principalmente de compostos aromáticos. Os terpenos são considerados produtos da fusão de duas ou mais unidades de isopreno (C_5H_8), tendo a fórmula geral $(C_5H_8)_n$. Possuem grupos funcionais como OH ou $C=O$ e geralmente são hidrocarbonetos insaturados de estrutura cíclica. Estes são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno, que variam de 2 a 8: *os monoterpenos*, ou simplesmente terpenos (Figura 5.2), possuem duas unidades de isoprenos com dez carbonos (duas unidades de isopreno); *os sesquiterpenos*, três unidades; e *os diterpenos*, quatro unidades. O aroma e o odor destes hidrocarbonetos são muito baixos, comparados com os de seus derivados oxigenados. Portanto, o seu teor no óleo é sempre reduzido.

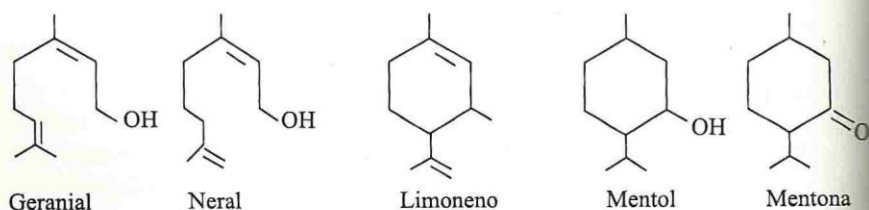


Figura 5.2 - Monoterpenos: duas unidades de isopreno.

Óleo de citrus – As frutas cítricas laranja, limão, lima, tangerina etc. possuem alta concentração de óleo essencial (>3,0%), sendo este comercialmente obtido como subproduto da produção de suco. Na prensagem, óleo e suco são extraídos simultaneamente, sendo o primeiro removido por centrifugação.

Este óleo é uma mistura de hidrocarbonetos do grupo de terpenos, sesquiterpenos, compostos oxigenados, como aldeídos, cetonas, ácidos, ésteres, éteres, fenóis, lactonas e pequenas quantidades de parafinas e ceras. Encontra-se alojado em bolsas e é removido da casca durante a extração do suco, sendo muito utilizado na indústria de alimentos, de cosméticos e farmacêutica, em tintas, inseticidas, borrachas, têxteis e produtos veterinários.

Normalmente, na indústria, a fração de terpenos sofre uma redução parcial, denominada desterpenação. Os objetivos desse processo são concentrar os componentes responsáveis pelo aroma (principalmente citral) e assegurar que o produto tenha maior estabilidade, tornando-o menos sensível à oxidação, e melhor solubilidade. O termo desterpenação é usado para designar este processamento, apesar de não ocorrer retirada total da fração de terpenos. Vários processos são utilizados para esse fim, como destilação fracionada a vácuo, extração seletiva por solventes, separação cromatográfica e, mais recentemente, desterpenação com CO₂-supercrítico (Capítulo 18).

- Óleo de laranja: obtido pela prensagem a frio da casca, possui elevado teor de limoneno (acima de 90%). O seu aproveitamento *in natura*, porém, é tecnicamente inviável, pois o alto teor de monoterpenos presente implica um produto instável, muito sensível a luz e calor. Os vários tipos de óleo apresentam diferença no teor de compostos oxigenados. Importante para o aroma são os aldeídos (octanal, decanal e citral) e os ésteres (acetato de octila e nerila) (Tabela 5.1).

- Óleo de limão: obtido da prensagem da casca, tem como principal componente os terpenos (limoneno, β -pineno e γ -terpineno). O limoneno é o principal constituinte, porém presente em menores quantidades que nos demais óleos, representando 60 a 75% do total do óleo. O odor característico do óleo de limão, o qual é diferente dos outros citros, deve-se à presença do citral (neral e geranial). O óleo essencial de limão tem aproximadamente 90% de terpenos não-oxigenados, os quais não contribuem significativamente para o *flavor* característico. Devido,

principalmente, a insaturações facilmente oxidadas em presença de calor, luz e oxigênio (eq. 5.1), há formação de aromas indesejáveis, originados de novos compostos formados. Os produtos da sua oxidação de maior contribuição para estes aromas indesejáveis são carveol e carvona.

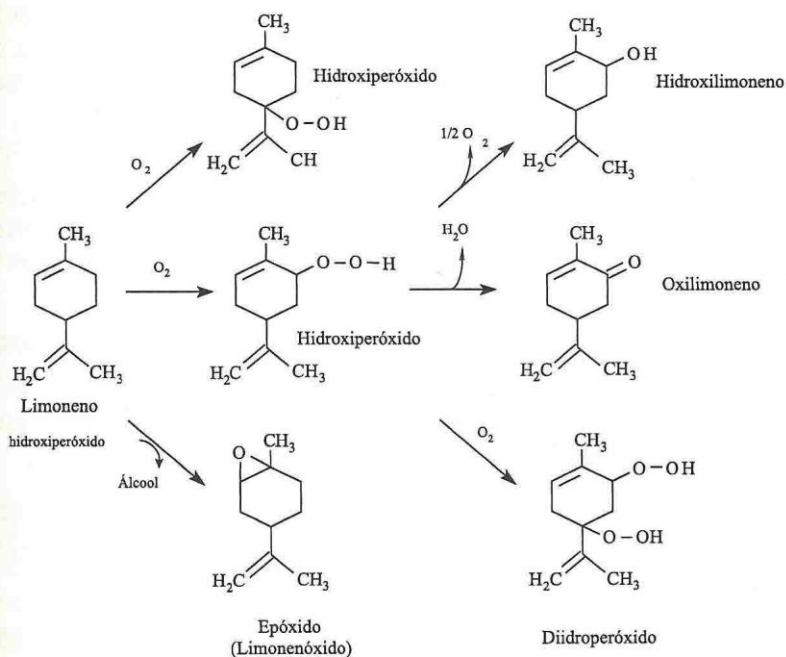
Tabela 5.1 - Composição do óleo de laranja-valência

Composto	Concentração
Etanol	0,1%
Acetato de etila	50 ppm
Acetal	20 ppm
Hexanal	200 ppm
Butirato de etila	0,1%
Trans-2-hexenal	50 ppm
Alfapineno	0,4%
Sabineno	0,4%
Mirceno	1,8%
Octanal	0,5%
Limoneno	93,6%
Linalool	0,5%
Decanal	0,6%
Neral	0,2%
Geranial	0,1%
Valenceno	1,7%

Os óleos essenciais utilizados industrialmente são, em sua maioria, destilados, obtidos também como subprodutos de vários processos de recuperação de essências. O *limoneno* é o principal componente do óleo essencial de citros. É muito sensível à oxidação, e os hidroperóxidos produzidos são muito instáveis, dando origem a uma mistura de

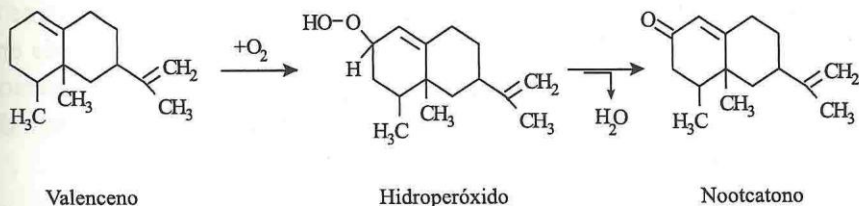
compostos oxigenados (eq. 5.1) que altera o *flavor* do suco “velho” ou enlatado.

eq. 5.1



De forma similar, o *valenceno* é oxidado para nootcatono (eq. 5.2), responsável pelo sabor amargo e rançoso em suco de laranja “velho”.

eq. 5.2



Óleo de aniz – Obtido a partir de sementes secas e constituído essencialmente de *anetole* (trans-1-p-metoxifenil-propeno), representa 80 a 90% do óleo e se cristaliza em temperatura ambiente (22 °C). O componente menor é o isômero p-allilanisole (3-p-metoxifenil-propeno), que se cristaliza em temperatura de resfriamento. A temperatura na qual ocorre o congelamento do óleo é utilizada pela indústria para estimar o teor de anetole e, portanto, a qualidade do óleo.

Óleo de erva-doce – Obtido de sementes, seu teor varia de 1,0 a 3,0% do peso da semente, contendo dois componentes principais: *carvone* e *limoneno*. Ambos possuem a unidade básica comum entre os monoterpenos: *1-metil-1-isopropileicicloexano*, sendo *carvone* seu principal constituinte (55%).

Óleo de hortelã – Obtido principalmente de folhas secas (88%) e, em menor proporção, de talos (12%), tem como principais componentes os monoterpenos oxigenados cíclicos mentol e mentona, sendo o primeiro responsável pelo sabor e odor refrescante.

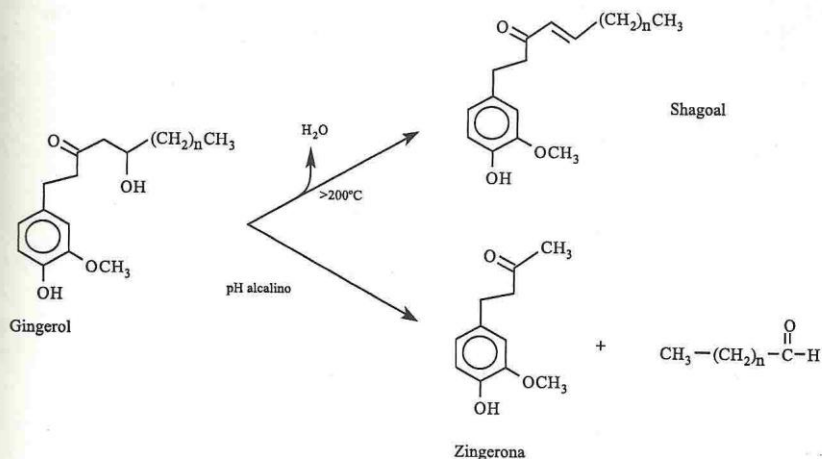
Óleo de cominho – Obtido da fruta seca, sendo seu principal constituinte volátil o *p-isopropilbenzaldeído*, contendo limoneno e outros compostos, que contribuem com seu aroma característico.

Óleo de cravo – Rico em *4-allil-2-metoxifenol* (eugenol 85%), apresentando compostos, em menores quantidades, como acetato de eugenol e sesquiterpeno cariofilleno.

Óleo de gengibre – Obtido do rizoma. O óleo essencial é constituído principalmente de monoterpenos (4%), sesquiterpenos (63%) e álcoois terpenos (17%), sendo seu componente mais abundante o sesquiterpeno *zingibereno* (30%). A substância pungente é o gingerol, que pode ser transformado em *shagoal* ou *zingerona* e *aldeído* durante a desidratação (eq. 5.3). A reação de formação do “shagoal” é acelerada em meio alcalino, e tanto a *zingerona* como o “shagoal” são menos pungentes que o gingerol. O aldeído alifático provoca o aparecimento de sabor estranho durante a preparação e o armazenamento da resina.

Óleo de alecrim – Obtido de folhas de alecrim por arraste com vapor. O óleo essencial é utilizado na indústria de perfumaria, e as folhas residuais são na extração de antioxidantes (Figura 5.3).

eq. 5.3



O extrato alcoólico das folhas após a remoção do solvente é utilizado diretamente como antioxidante somente em certos tipos de alimentos, em razão de sua coloração verde e seu *flavor* típico. As substâncias com atividade antioxidante identificadas no extrato são: *ácido rosmarínico*, *carnosol* e *ácido carnósico* (Figura 5.4).

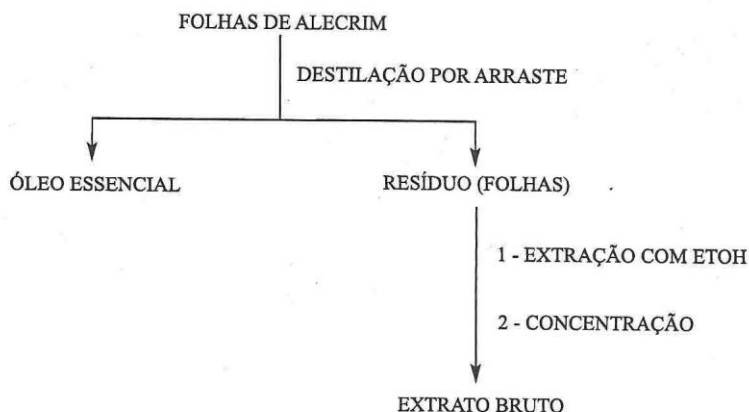


Figura 5.3 - Preparação do extrato bruto de alecrim com ETOH.

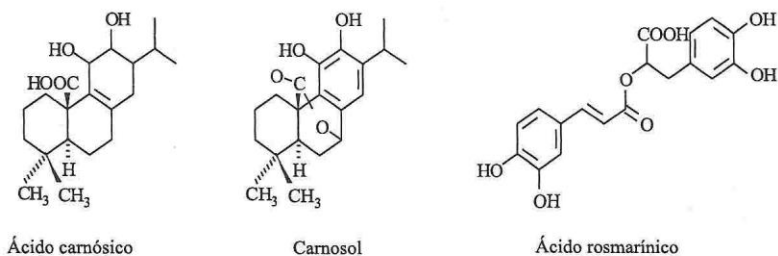


Figura 5.4 - Estruturas dos antioxidantes em alecrim.

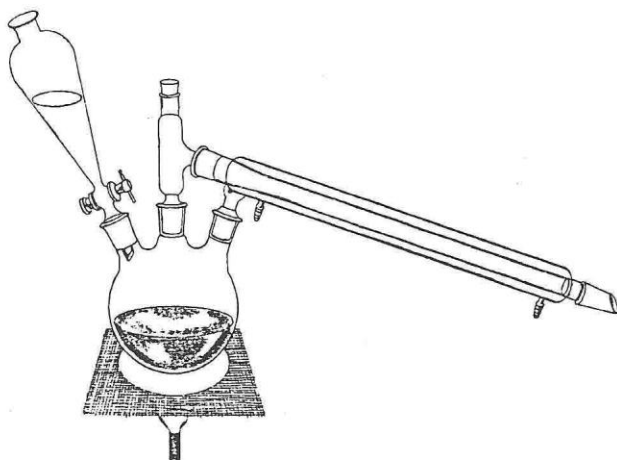
Extração, Cromatografia e Determinação de Aldeídos

Reagentes

- Amostra seca.
- Cloreto de metileno, hexano e éter dietílico.
- Sulfato de sódio.

Procedimento

- Transferir 10,0 g da amostra para balão de 500 ml + 150 ml de água e montar o conjunto conforme a ilustração da figura abaixo:



- Aquecer a mistura até o início da destilação e adicionar água do funil na mesma velocidade da destilação, para manter o nível da mistura original.
- Coletar o destilado até que gotas do óleo destilando não sejam visíveis; um mínimo de 100 ml deve ser coletado.
- Transferir o destilado para o funil de separação, lavar com cloreto de metileno (5,0 ml), agitar e esperar a separação de fases.
- Remover a fase orgânica para tubo de ensaio de peso conhecido.
- Repetir a extração com cloreto de metileno (3,0 ml).
- Se o extrato estiver opaco, adicionar sulfato de sódio, agitar e filtrar em outro tubo de ensaio de peso conhecido.
- Evaporar o solvente em banho-maria e borbulhar nitrogênio.
- Pesar o óleo e calcular o rendimento da extração.

Cromatografia de camada fina

- Transferir de 10-20 μ l do óleo de gengibre para a placa de sílica-gel 60 F-254.
- Promover a separação em hexano:éter dietílico (3:7).
- Após a separação, visualizar na luz UV a 254 nm.
- Remover as manchas da placa com metanol, filtrar e evaporar o solvente.
- Testar organolepticamente as frações e verificar qual mancha (ou manchas) possui o sabor pungente.

Determinação do teor de aldeído no óleo essencial

Aldeídos são ingredientes importantes do óleo obtido de frutas cítricas. A medição do aldeído total oferece conveniente índice de qualidade do óleo. O princípio da determinação é baseado na liberação do HCl, proveniente da reação do aldeído com o hidrocloreto de hidroxilamina, o qual é posteriormente titulado com solução-padrão de NaOH.

Reagentes

- Hidrocloreto de hidroxilamina.
- Solução de NaOH 0,1 N padronizada.

Procedimento

- Transferir 5,0 g do óleo para erlenmeyer de 125 ml.
- Adicionar 35 ml de solução 0,5 N de HCl hidroxilamina (34,75 g em 40 ml de água morna), completar o volume para 1,0 l (com álcool isopropílico) e ajustar o pH para 3,5.
- Agitar a mistura durante 30 min em temperatura ambiente e titular com NaOH até pH = 3,5.
- Calcular a porcentagem de aldeído.

Obs.: No óleo de limão, utilizar o PM do citral e, no óleo de laranja, o de decanal.

REFERÊNCIAS

- BELITZ, H-D; GROSCH, W. **Food chemistry**. New York: Spring-Verlag, 1999. 774 p.
- FARREL, K. N. **Spices, condiments, and seasonig**. 2. ed. New York: AVI book, 1990. 415 p.
- HAWTHORNE, S. B.; RIEKOLA, M. L.; SERENIUS, K. Comparison of hydrodistillation and supercritical fluid extraction for the essential oils in aromatics plants. **J. Chrom.**, v. 634, p. 297-308, 1993.
- HIRASA, K.; TAKEMASA, M. **Spice science and technology**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1998. 219 p.
- KERROLA, K. Literature review: isolation of essential oils and flavor compounds by dense carbon dioxide. **Food Review International**, v. 11, p. 547-573. 1995.
- MAZZA, G. **Functional foods**. Lancaster, PA: Technomic publication, 1998. 460 p.
- SCHWEIGGERT, U., CARLE, R., SCHIEBER, A. Conventional and alternative processes for spice production – a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, p. 260-268, 2007.

TOXICANTES NATURAIS

Introdução

Vários alimentos consumidos regularmente contêm diversas substâncias químicas consideradas tóxicas. Algumas podem ser letais se ingeridas em quantidade *apropriada*, outras interferem na digestibilidade, absorção ou utilização de nutrientes, afetando a qualidade nutricional do alimento. Estas substâncias, em sua grande maioria, são constituintes naturais produzidos por vegetais para proteção contra ataques de pássaros, insetos e microrganismos.

Em vegetais, a maioria destas substâncias é oriunda dos processos biossintéticos, os quais incluem produtos de síntese da própria planta ou metabólitos de origem microbiana. Por outro lado, substâncias tóxicas são formadas em alimentos, como resultado de métodos tradicionais de cozimento e, ou, preservação, sendo seus efeitos biológicos diversos e complexos (Quadro 6.1).

Quadro 6.1 - Toxicantes formados pela interação de ingredientes

Toxicantes	Interação de ingredientes
Nitrosaminas	Nitritos e aminas
Lisinoalanina	Proteína e base
D-aminoácidos	Proteína e base
Peróxido (lipídios)	Ácido graxo insaturado e oxigênio
Óxido de colesterol	Colesterol e oxigênio
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	Calor + substâncias orgânicas
Metais pesados	Embalagens metálicas e ácidos

A toxicidade destas substâncias é determinada não somente por suas propriedades química e biológica, mas também pelo nível de exposição e duração a que o indivíduo é submetido. O homem aprendeu com o decorrer do tempo a evitar certos tipos de plantas e animais e a consumi-los em determinado estágio de desenvolvimento ou quando preparados adequadamente.

As toxinas naturais não apresentam problemas agudos ao consumidor em circunstâncias normais. Entretanto, problemas podem ocorrer quando práticas convencionais de preparo são alteradas. Na maioria das vezes, a existência desses compostos no alimento é conhecida e seus níveis de consumo são relativamente baixos.

Inibidores de Proteases

São proteínas de baixo PM (8.000-10.000) encontradas em feijão, ervilha, lentilhas, amendoim, milho, arroz, soja, batata e clara de ovo, e sua ação é verificada pela inibição de enzimas proteolíticas (tripsina, quimotripsina). A interação desses inibidores com as proteases é de tal forma que as torna indisponíveis para realizarem suas funções digestivas de hidrolisar as proteínas (Figura 6.1). Como consequência, a proteína torna-se nutricionalmente indisponível.

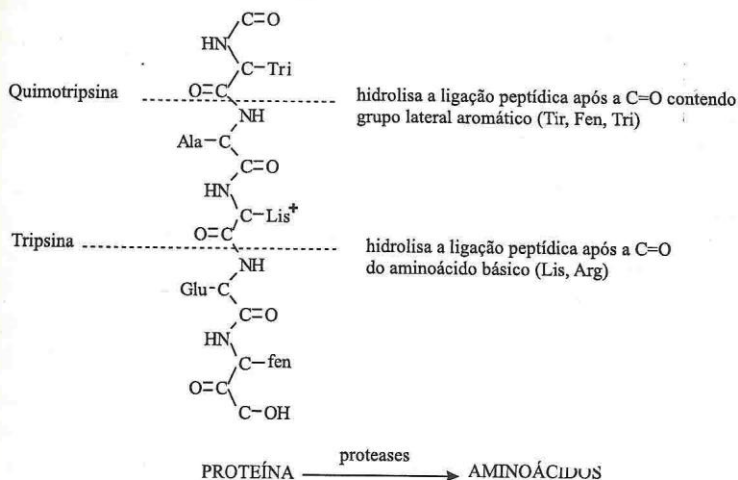


Figura 6.1 - Ação das proteases sobre as proteínas.

O organismo humano aparentemente tolera baixos níveis de inibidores de proteases, mas níveis elevados provocam o crescimento do pâncreas, em razão da contínua produção das enzimas digestivas. Alguns inibidores são facilmente destruídos com aquecimento moderado (cozimento), enquanto outros são relativamente estáveis ao calor. Em geral, o aquecimento úmido em temperatura de 100 °C/15 min é suficiente para destruí-los.

Glicosídeos Cianogênicos

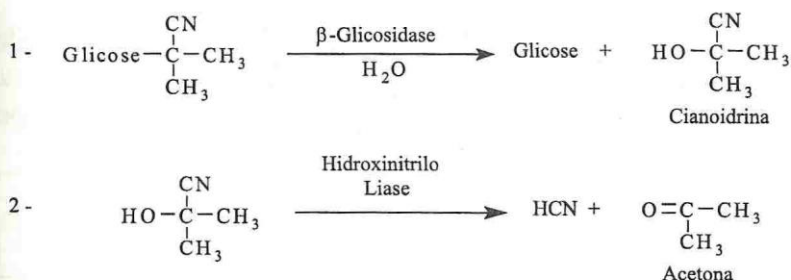
São compostos químicos que liberam o ácido cianídrico (HCN) após a ação de certas enzimas. Os cianogênicos estão presentes em alguns tipos de vegetais utilizados na alimentação humana, especialmente na mandioca (Tabela 6.1).

Tabela 6.1 - Anogênicos em mandioca e sorgo

Planta	HCN (mg/100 g peso fresco)
Mandioca	
Menos tóxica (mansa)	
Tubérculo	69
Folha	77
Mais tóxica (brava)	
Tubérculo	84
Folha	104
Sorgo	
Semente madura	0
Folhas novas	60

Os compostos cianogênicos por si sós não são tóxicos. O HCN liberado a partir da *linamarina* encontrada na mandioca, pela ação enzimática (eq. 6.1), é o responsável pela toxidez. Duas enzimas estão envolvidas no processo de liberação do ácido cianídrico, e ambas estão presentes no tecido vegetal contendo o cianogênico. A reação ocorre quando o tecido vegetal é triturado, como no processamento ou na ingestão, permitindo o contato entre o substrato e a enzima.

eq. 6.1



Betaglicosidase: hidrolisa a molécula do cianogênico para cianoidrina e açúcar; e

Hidroxinitrilo liase: promove a dissociação da cianoidrina para acetona e ácido cianídrico.

O descascamento da mandioca, seguido de um intervalo de tempo em água, permite a degradação da linamarina, e o HCN produzido é liberado da raiz, permitindo seu uso como alimento. A autólise da linamarina não ocorre quando a mandioca é aquecida imediatamente após o descascamento. A enzima *betaglicosidase* é inativada pelo calor, mas a linamarina é estável ao aquecimento. Neste caso, ela pode ser convertida em seus subprodutos (glicose, HCN e acetona) pela ação enzimática produzida pela flora intestinal.

A quantidade de HCN liberada se altera conforme a variedade. A dose letal de HCN para a espécie humana é de 0,5 a 3,5 mg/kg de peso vivo. A partir de 100 g de mandioca, podem-se obter até 40 mg de HCN, valor que se aproxima da dose letal para um indivíduo de pequeno porte. O ácido cianídrico atua na inibição da *citocromoxidase*, resultando na interrupção da respiração celular. Pequenas quantidades de HCN podem ser eliminadas do organismo pela ação da enzima *rodanase* presente no fígado (eq. 6.2). Essa reação requer suprimento de tiosulfato, e o produto final é o tiocianato, que é *goitrogênico*.

eq. 6.2



Glicosinolatos

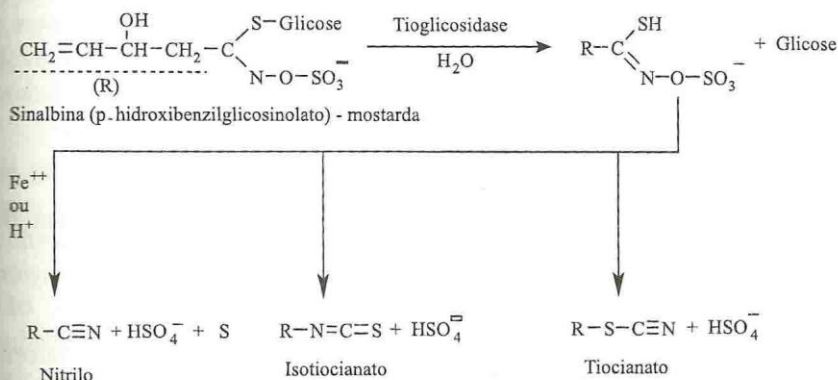
São compostos que contêm enxofre, de ocorrência em crucíferas (repolho, couve-flor, brócolis, mostarda, rabanete) (Tabela 6.2). O sabor pungente e o aroma característico destes vegetais são, em grande parte, devidos ao glicosinolato ou aos produtos de sua degradação.

Tabela 6.2 - Teor de glicosinolato em crucíferas

Vegetal	Glicosinolato (mg/g)
<i>Repolho</i>	
Vermelho	0,451 - 1,09
Branco	0,26 - 1,56
<i>Couve-flor</i>	0,61 - 1,14
<i>Rabanete</i>	
Vermelho	0,42 - 1,17
Branco	0,57 - 1,19
<i>Mostarda</i>	
Branca	22 - 52
Preta	18 - 60

Os glicosinolatos são hidrolisados pela *tioglicosidase*, após o esmagamento do vegetal, liberando *glicose*, *enxofre*, *nitrilos*, *tiocianatos* e *isotiocianatos* (eq. 6.3). A aglicona produzida pela ação enzimática do glicosinolato forma predominantemente o isotiocianato, responsável pelo *flavor* pungente. A formação de nitrilo é maior em meio ácido e na presença de íons metálicos.

eq. 6.3



Glicosinato - 27 tipos conhecidos, diferindo-se pelo grupo (R)

O isotiocianato é metabolizado *in vivo* para tiocianato, que é goitrogênico. O efeito goitrogênico resulta da competição com o iodo, inibindo a associação com a tiróide. Elevada ingestão de crucíferas associada com a baixa ingestão de iodo pode provocar o goiter. O cozimento destrói a enzima tioglicosidase, mas a ingestão de vegetais cozidos contendo glicosinatos não previne a formação do tiocianato, pois a flora bacteriana presente no trato intestinal produz a tioglicosidase.

Glicoalcalóides

Em alimentos, os glicoalcalóides são peculiares aos vegetais da família *solanaceae* (batata, tomate, berinjela). A batata (*Solanum tuberosum*), mesmo considerada alimento tradicional, possui tóxicos glicoalcalóides. No tubérculo, 95% ou mais dessas substâncias são a *alfasolanina* (40%) e a *alfachaconina* (60%). Ambos os tipos possuem a unidade aglicona denominada *solanidina* e estão ligados aos carboidratos *betasolatriose* (cadeia de açúcar formada pela sequência *gal-gli-ram*) e *betachacotriose* (*glu-ram-ram*), respectivamente (Figura 6.2).

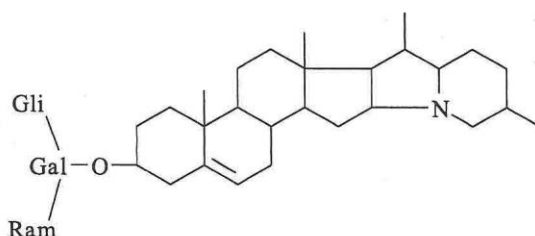


Figura 6.2 - Estrutura da α -solanina. A α -chaconina é composta de unidade de glicose e duas de ramanose.

A concentração de glicoalcalóides é controlada por fatores genéticos, práticas agrícolas e tratamento pós-colheita. O teor de alfasolanina e alfachaconina diminui durante o armazenamento em temperatura de 4 a 10 °C, mas aumenta entre 8 e 15 °C. Exposição à luz branca acelera a síntese de glicoalcalóides. Os procedimentos de cozimento não alteram os níveis existentes. A maioria das variedades comerciais de batata contém glicoalcalóides em níveis de 2 a 15,0 mg/100 g, sendo as concentrações mais elevadas encontradas na casca e nos brotos (Tabela 6.3). Diferenças existem também entre as variedades, algumas contendo até 30,0 mg/100 g.

Tabela 6.3 - Níveis de glicoalcalóides em várias partes da planta e produtos comerciais.

Partes da planta	Glicoalcalóide (mg/kg)
Flores	2.150-5.000
Folhas	230-1.000
Caule	22-33
Tubérculo	10-50
casca (2-3% tubérculo)	300-640
brotos	2.000-7.300
Batata frita	0,4-8,0
Batata cozida	27-42
Batata assada	99-113
Pele frita	567-1.450
Purê de batata	2-5,0
Farinha de batata desidratada	65-75

HAPs presentes na fumaça oriunda da gordura pirolisada são, então, absorvidos pela carne.

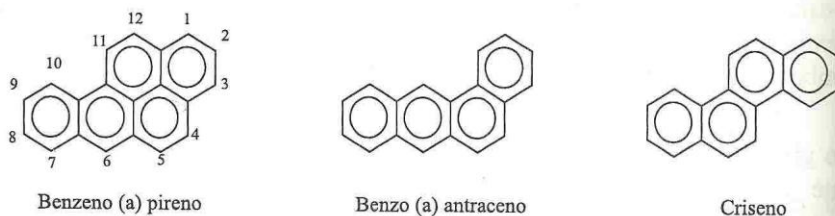


Figura 6.3 - Estrutura dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.

A concentração de HAP depende do teor de gordura na carne, do processo de aquecimento (contato da gordura com a superfície aquecida) e da fonte de aquecimento, podendo ser encontrados em quantidades de até 50,0 ppm.

Após a ingestão, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são metabolizados para derivados intermediários responsáveis por seu efeito carcinogênico (Figura 6.4).

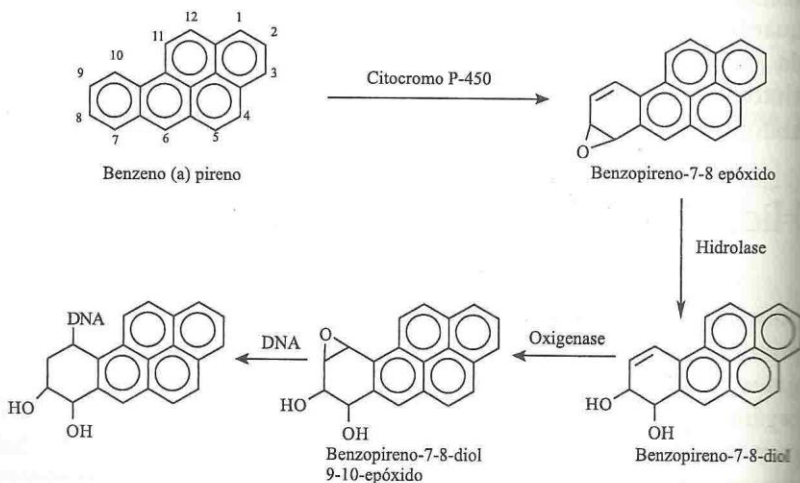


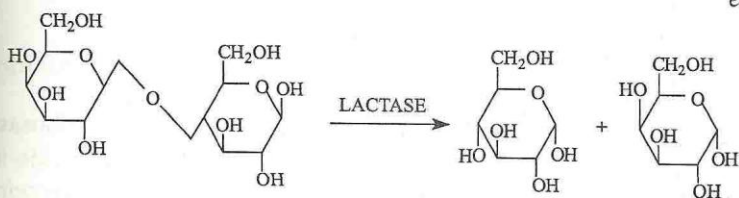
Figura 6.4 - Conversão do benzopireno pelas enzimas do fígado em derivado epóxido carcinogênico.

Fatores Antinutricionais

São todos aqueles tipos de substâncias que de alguma forma provocam a destruição de nutrientes essenciais ou "insultam" o organismo, alterando a digestão, a absorção e o metabolismo.

Lactose

É o principal carboidrato presente no leite (5%). Para ser metabolizada, ela tem de ser hidrolisada pela enzima lactase em glicose e galactose (eq. 6.4). Aproximadamente 70% da população mundial é intolerante à lactose, e a ingestão de leite e derivados causa desconforto intestinal, em razão dos baixos níveis de lactase no intestino. Em processos industriais, o leite é tratado com lactase de origem microbiana, e porção substancial (95%) da lactose é hidrolisada para glicose e galactose.



Quando o processo digestivo normal não ocorre, a lactose inalterada não é absorvida pelo intestino, sendo fermentada pela flora microbiana, com formação de ácido lático, ácidos graxos de cadeia curta, gás carbônico e hidrogênio. Essas substâncias, além de aumentar a osmolaridade do conteúdo do cólon e abaixar o pH, provocam a diarreia e a flatulência.

Flatulentos

A flatulência é atribuída à ausência da enzima α -galactosidase necessária para promover a hidrólise das ligações α -galactosídicas dos oligossacarídeos rafinose e estaquiose (Figura 6.5) presentes no feijão, na soja etc. Esses carboidratos são metabolizados pela flora intestinal,

produzindo gás carbônico, hidrogênio e metano. A produção desses gases provoca a flatulência (náusea, dores abdominais e diarreia).

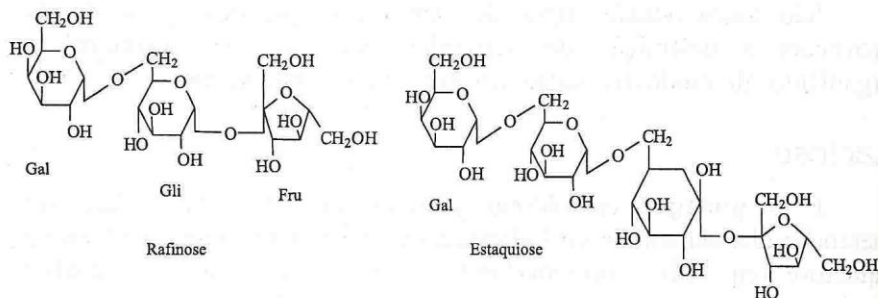


Figura 6.5 - Estrutura da rafinose e estaquiose.

São estáveis ao aquecimento, não sendo destruídos durante o cozimento e, ou, pelo processamento térmico. O processo de remoção consiste em ligeira ebulição e repouso na água por um período de 15 horas, ocorrendo a difusão para a água, que deve ser eliminada.

Ácido Fítico

Encontrado em alimentos como legumes, cereais e oleaginosas em concentrações variadas (0,1 – 6%). É considerado antinutriente devido a sua habilidade de se ligar diretamente ou indiretamente com minerais, proteínas e amido alterando a solubilidade, funcionalidade e digestibilidade (Figura 6.6).

Na faixa de pH encontrado em alimentos, os seis grupos fosfato estão carregados negativamente, tornando o ácido fítico (Figura 6.7) altamente reativo com as partículas carregadas como os minerais e proteínas. Esta interação é pH dependente. Íons minerais podem-se ligar com um ou mais grupo fosfato em uma ou mais molécula do ácido fítico, formando complexos de solubilidade e estabilidade variada.

As proteínas positivamente carregadas em pH abaixo de seu ponto isoelétrico podem-se ligar diretamente ao ácido fítico por meio de atrações eletrostáticas. Em pH intermediário acima do ponto isoelétrico, a ligação entre o ácido fítico e proteínas é mediado pela ação do cálcio pelo fato de ambas as partículas estarem negativamente carregadas. Em pH elevado, o complexo *ácido fítico-cátion-proteína* pode-se dissociar com a precipitação do ácido fítico como *cátion-ácido fítico*. A ligação com as

moléculas do ácido fítico não é necessariamente eletrostática, pois a ligação com o amido pode ocorrer através de pontes de hidrogênio ou indiretamente através de proteínas com os quais o amido pode estar associado. Esta interação com subsequente alteração na digestibilidade e disponibilidade dos nutrientes é responsável pelos efeitos adversos e benéficos do ácido fítico.

O grau de indisponibilidade dos minerais depende da concentração do ácido fítico e do mineral, bem como a força da ligação. O zinco forma complexo muito estável e insolúvel, sendo entre todos o mais afetado. O processamento de alimentos aumenta a insolubilidade do complexo mineral-ácido fítico, diminuindo a sua disponibilidade.

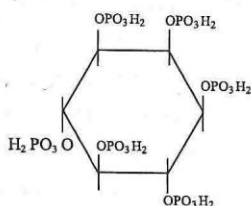


Figura 6.6 - Estrutura básica do ácido fítico.

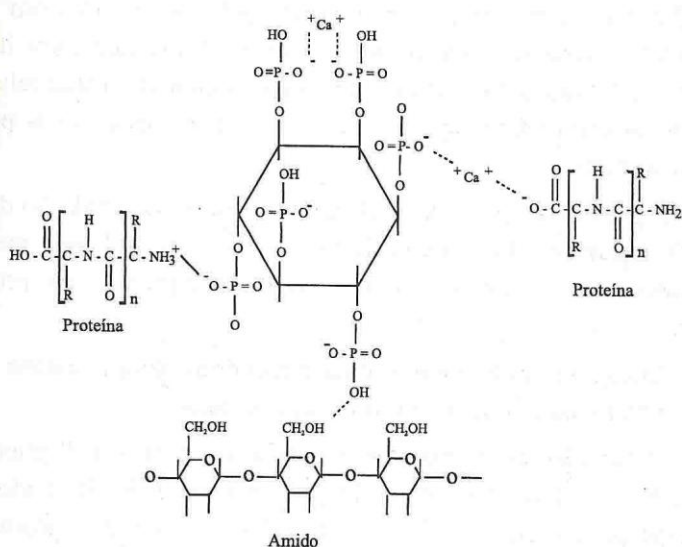


Figura 6.7 - Interações possíveis do ácido fítico com minerais e proteínas.

O processamento de alimento pode também aumentar a degradação do ácido fítico por meio do repouso em água, fermentação e germinação do grão. O processo de extrusão de mistura rica em fitatos reduz a disponibilidade do zinco. Esta redução pode se dar em razão da inativação de fitases endógenas ou pela formação de complexo não-digestível. A neutralização da proteína da soja forma complexo muito forte entre o zinco e o ácido fítico, o qual resiste à digestão, enquanto a proteína de soja precipitada com ácido é menos reativa com o ácido fítico e minerais, em razão de se encontrar na forma protonada.

Efeitos benéficos potenciais do ácido fítico estão relacionados com a sua habilidade de abaixar o nível de glicose no sangue pela redução da digestão do amido. Os taninos também apresentam o mesmo efeito e mecanismo. Tais compostos podem-se ligar diretamente com a amilase inativando-a. Indiretamente, o ácido fítico e os taninos podem se ligar ao cálcio requerido para a ativação da atividade da amilase ou, possivelmente, com o amido, afetando a sua gelatinização ou o acesso às enzimas digestivas.

O ácido fítico atua reduzindo o colesterol plasmático e os níveis de triacilgliceróis. Este efeito se verifica pela interação com o zinco diminuindo a relação zinco/cobre no plasma, conhecido fator indutor de doenças cardiovasculares. Outros benefícios potenciais estão relacionados ao efeito protetor na redução de câncer, e vários mecanismos podem ser assim resumidos:

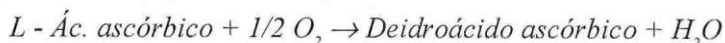
- Ligação com o ferro, catalisador da reação de oxidação de lipídios (cap. 1), reduzindo a formação de radicais livres e, subseqüentemente, o rompimento da membrana celular com conseqüência da proliferação celular.

- Ligação com o zinco, o qual é requerido para a síntese do DNA, portanto reduzindo também a proliferação celular.

- Interação com enzimas bacterianas, como a β -glicosidase e mucinase no cólon, portanto reduzindo a conversão de ácidos biliares primários para secundários, os quais são considerados promotores da tumorigênese.

Ascorbato oxidase

A enzima ascorbato oxidase ocorre naturalmente em certos tipos de vegetais e catalisa a oxidação do ácido ascórbico:



Ao contrário das outras oxidases, ocorre a formação da água em vez da H_2O_2 . Na ausência da enzima, o ácido ascórbico é oxidado pelo oxigênio para deidroácido ascórbico e H_2O_2 e a água oxigenada resultante provoca adicional destruição da vitamina C.

A oxidação enzimática do ácido ascórbico é importante para a indústria de sucos. Durante a extração, deve-se limitar a ação desta enzima, removendo o oxigênio, e manter o produto por um tempo mínimo à temperatura baixa até que se processe a pasteurização.

Lipoxigenases e peroxidases

Estas enzimas participam da oxidação e subsequente destruição de ácidos graxos insaturados, vitamina A e seus precursores (retinóides). Os ácidos graxos essenciais são destruídos diretamente, enquanto os carotenos e a vitamina A o são indiretamente (cap. 1). A resistência térmica dessas enzimas depende da origem e das características do alimento (pH, composição e presença de partículas). O binômio tempo-temperatura de branqueamento deve ser determinado para cada caso.

Glicoalcalóides: Extração e Detecção

Extração

- Homogeneizar em liquidificador 100 g de polpa de batata ou 50 g de casca com 50 ml de metanol:clorofórmio (2:1).
- Filtrar a vácuo o extrato em papel-filtro Whatman nº1.
- Lavar o papel com 50 ml da mistura de solvente.

- Concentrar o filtrado para 10,0 ml em evaporador rotatório (50 °C) e adicionar 15,0 ml de HCl 0,2 N, deixando em repouso por cinco minutos.
- Centrifugar a mistura a 38.000 g/30 min a 4 °C e descartar o precipitado.
- Adicionar ao sobrenadante 30 ml de NH₄OH concentrado a 25%, até pH 11,0, e deixar em repouso em banho-maria a 70 °C/30 min.
- Deixar novamente em repouso em geladeira, por 24 horas.
- Centrifugar a 38.000 g/30 min a 4 °C e coletar o precipitado.
- Dissolver o precipitado em 10 ml com a mistura acetonitrila: água (50:50).
- Filtrar em Millipore 0,45 µm, retirando alíquotas para as determinações de CCF e CLAD.

Cromatografia de camada fina

- Utilizar placas de sílica-gel ativadas a 105 °C/ 20 min.
- Desenvolver o cromatograma contendo amostra e os padrões, utilizando a fase móvel clorofórmio:metanol:amônia 2% (70:30:5).
- Expor, após o desenvolvimento monodimensional, por duas vezes as placas aos vapores de iodo/20 min e borrifá-las com H₂SO₄ 10% em etanol.
- Aquecer as placas a 105 °C/10 min e identificar os glicoalcalóides com o auxílio da luz UV (365 nm).

REFERÊNCIAS

- BELITZ, H-D; GROSCH, W. **Food chemistry**. New York: Spring-Verlag, 1999. 774 p.
- CONN, E. E. Cyanogenic glycosides. **J. Agric. Food Chem.**, v. 17, p. 519-526, 1969.

AFLATOXINAS

Introdução

Aflatoxinas são metabólitos carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos produzidos por várias estirpes de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius* em diversos produtos: amendoim, castanha, milho, arroz, trigo, cevada, cerveja, leite, carne, semente de algodão, mandioca e outros produtos que suportam o crescimento do *Aspergillus*.

A ocorrência de aflatoxina em alimentos é inevitável e influenciada por diversos fatores ambientais. A extensão de sua contaminação não é previsível e pode variar com a localização geográfica, as práticas agrônômicas e a suscetibilidade do produto à invasão do fungo durante as fases de pré-colheita, armazenamento e processamento. Estima-se que 25% da produção mundial de produtos agrícolas esteja contaminada por aflatoxinas, com os níveis variando drasticamente de país para país.

A contaminação geralmente ocorre durante a fase de produção do alimento, podendo aumentar em condições adversas de armazenamento e comercialização. A abertura física, promovida pelo ataque de insetos ou em razão dos danos causados pela colheita mecânica, favorece a penetração do fungo e a conseqüente produção da toxina. Na maioria das vezes, o alimento não apresenta sinais visíveis de contaminação (mofo).

Estrutura Química

As aflatoxinas pertencem à classe de compostos denominados furanocumarinas. Todas possuem um núcleo, *cumarina*, associado ao

furano e à lactona (Figura 7.1). As aflatoxinas do grupo B possuem anel ciclopentenona e as do grupo G, lactona insaturada, enquanto as do grupo M são derivados hidroxilados de B₁ e B₂. A AFM₁ é a forma hidroxilada da AFB₁; aparece em leite, urina e fezes como produto do seu metabolismo. O processamento térmico do leite não afeta a concentração da AFM₁. A toxicidade decresce na seguinte ordem: B₁ > M₁ > G₁ > B₂ > M₂ = G₂. Quando irradiada com a luz ultravioleta (UV), as seis toxinas emitem fluorescência diferente:

B₁ e B₂ – Blue (azul)

G₁ – Green (verde)

G₂ – Green-blue (verde-azulado)

M₁ – Blue-violet (azul-violeta)

M₂ – Violet (violeta)

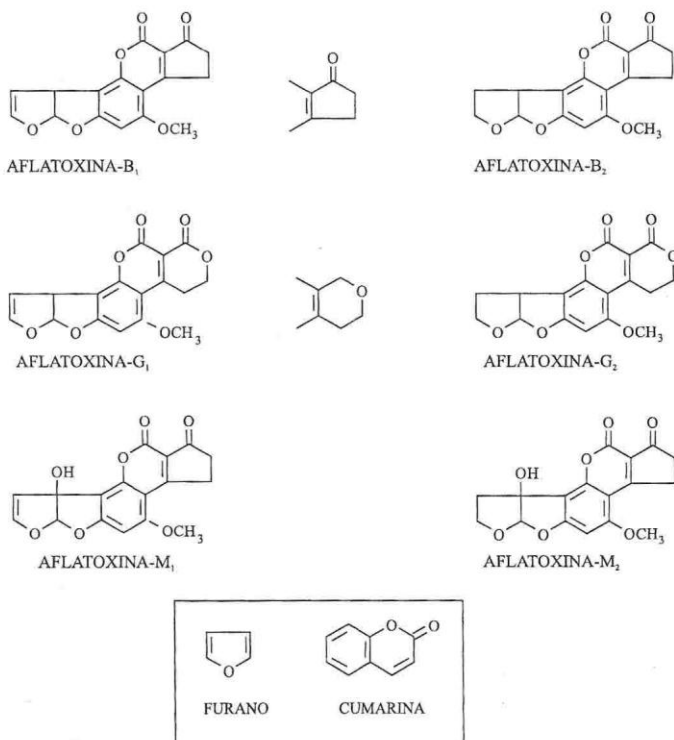


Figura 7.1 - Estrutura das aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂.

Importância

Há interesse pelas aflatoxinas por duas razões: *toxidez* e *carcinogenicidade*. A aflatoxina é tóxica para a maioria dos animais, com valor de $LD_{50} = 0,5$ mg/kg de peso de animais novos vivos (Tabela 7.1). O consumo de quantidade suficiente da toxina ocasiona morte em 72 horas (lesões no fígado, hemorragia no trato intestinal). A parte da molécula responsável pela ação mutagênica da aflatoxina é a região insaturada localizada entre o C₂-C₃. Ingestão de quantidades subletais provoca lesões severas ou moderadas no fígado. A lesão mais comum é o excessivo crescimento de células desse órgão. Esta é a forma de câncer reconhecida como o carcinogênico mais potente, e seus principais receptores celulares são as proteínas e os ácidos nucleicos.

Tabela 7.1 - Relação entre a concentração de aflatoxina e a incidência de câncer no fígado de ratos

Aflatoxina (mg/kg)	Duração (dias)	Incidência de tumores no fígado
5,0	370	14/15
3,5	340	11/15
3,5	335	7/10
1,0	294	5/9
1,0	323	8/15
0,2	360	2/10
0,2	361	1/10
0,005	384	0/10

Metabolismo da Aflatoxina-B₁

As aflatoxinas são facilmente absorvidas pelo trato gastrointestinal. O contaminante encontrado com mais frequência em produtos utilizados diretamente na alimentação é a aflatoxina-B₁, considerada a mais tóxica

do grupo. Em geral, mais de 90% da dose de AF-B₁ ingerida é eliminada pelo organismo em 24 horas (Figura 7.2).

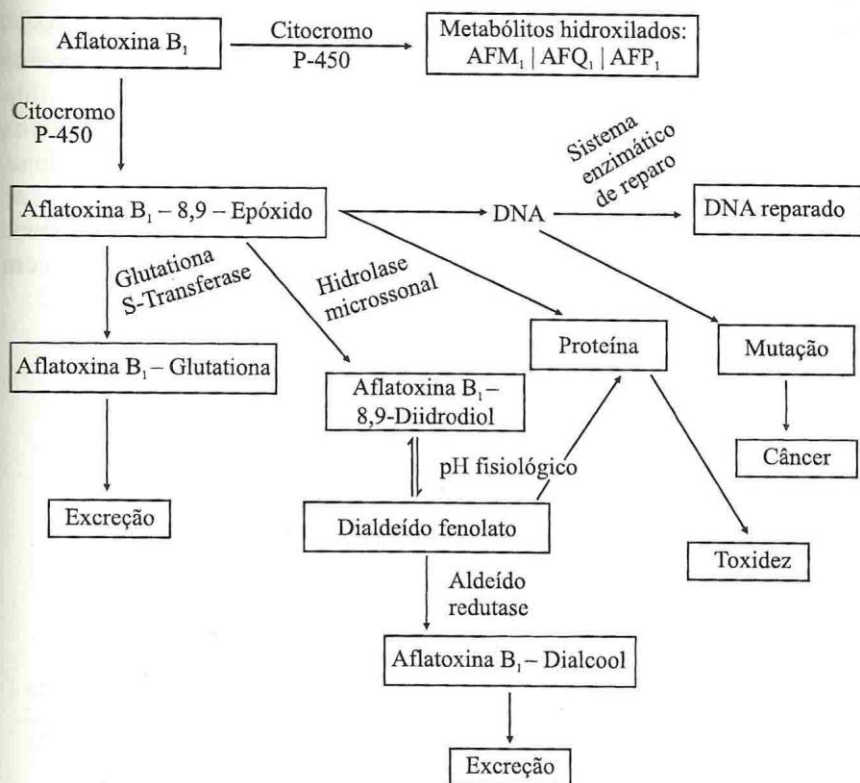


Figura 7.2 - Biotransformação metabólica da aflatoxina B₁.

A inativação e a posterior eliminação da aflatoxina B₁-epóxido podem ocorrer pela interação com a glutathione (gamma-L-glutamil-L-cisteinil-glicina; GSH). Esse tripeptídeo (eq. 3.1), presente nas células animal, vegetal e de microrganismos, é o principal mecanismo de defesa celular, pois reduz a mutagenicidade das aflatoxinas, tornando-as mais solúveis em água e, portanto, mais facilmente elimináveis (Figura 7.2). Importante precursor da glutathione é a cisteína. O consumo desse aminoácido aumenta a concentração do tripeptídeo, reduzindo os efeitos maléficos de componentes tóxicos no organismo.

A variação substancial desse processo, isto é, a velocidade de eliminação da aflatoxina, ocorre entre as espécies. O complexo enzimático localizado no retículo endoplasmático de células hepáticas, denominado *oxidases de função mista*, metaboliza a aflatoxina- B_1 para diversos derivados (Figura 7.3). Diversas substâncias encontradas nos alimentos como selênio, clorofilina, vitaminas A e C, e sulfeto de alila protegem o organismo da AFB $_1$. Em níveis metabólicos, a aflatoxina requer ativação para exercer o seu efeito biológico. Dois principais métodos de proteção parecem então ser possível: *reduzir o nível de ativação ou aumentar o nível de detoxificação*. Os mecanismos envolvidos são distintos: alguns complexam a aflatoxina, outros removem a aflatoxina-epóxido.

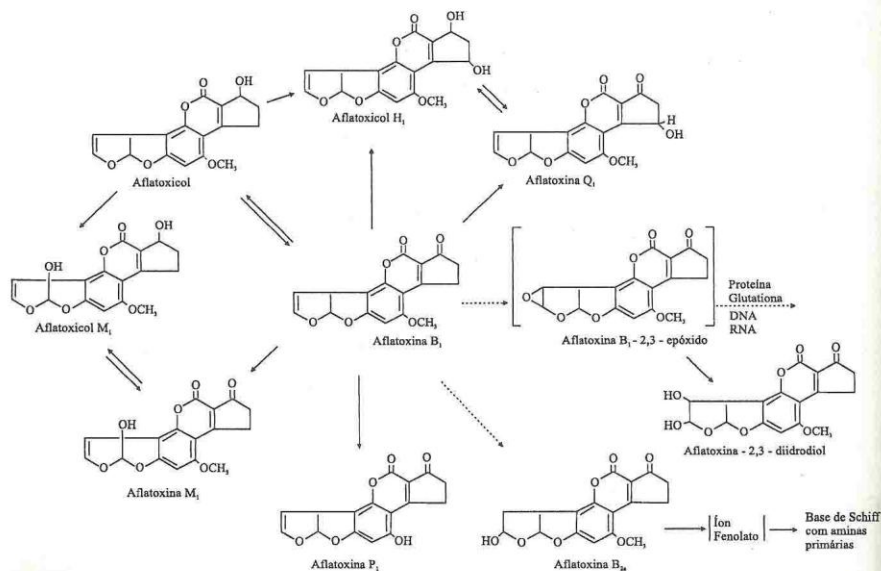


Figura 7.3 - Estrutura das aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 , G_2 , M_1 , M_2 .

Dos derivados formados enzimaticamente (AFB $_1$ -8-9 epóxido e formas hidroxiladas menos mutagênicas), a aflatoxina- B_1 -epóxido (Figura 7.4) é de particular importância. Esta forma molecular ativa pode interagir co-valentemente com ácidos nucleicos (DNA, RNA) e proteínas, tornando essas macromoléculas biologicamente inativas.

A aflatoxina-epóxido é altamente reativa e instável. Este epóxido é bastante eletrofílico e, por consequência, se liga co-valentemente a vários locais nucleofílicos da célula, como: DNA, RNA e proteínas (metionina, cisteína e histidina), resultando na interferência do funcionamento normal da célula.

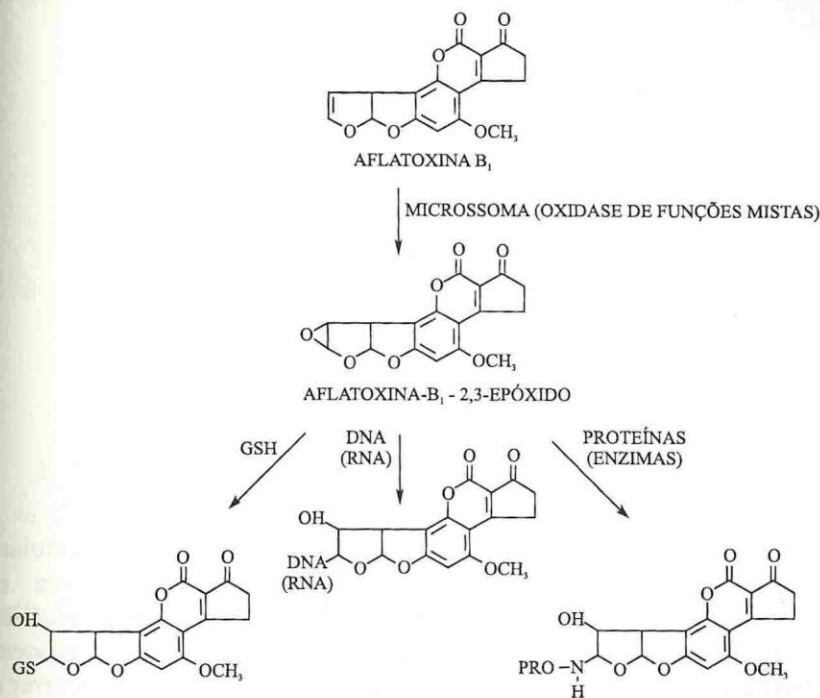


Figura 7.4 - Reações bioquímicas da aflatoxina - B₁.

Interação Aflatoxina-Ácidos Nucléicos

A formação do complexo *Aflatoxina-DNA* representa a lesão bioquímica inicial produzida pela aflatoxina. A lesão causada na molécula do DNA possivelmente leva à mutação e ao câncer, dada sua incapacidade de servir de modelo apropriado para sua duplicação e síntese da proteína (Figura 7.5).

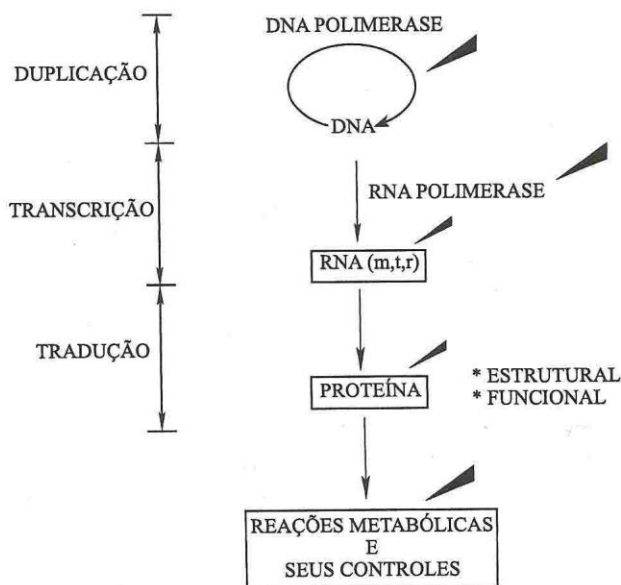


Figura 7.5 - Locais de atuação da aflatoxina na síntese de proteína.

As aflatoxinas interagem com diferentes componentes celulares envolvidos na síntese de proteína. Essas interações podem ser classificadas em dois grupos: inibição da síntese de ácidos nucleicos (processo de transcrição) e interferência na síntese de proteína (processo de tradução). A interferência na síntese de ácido nucleico pode ocorrer de duas maneiras:

- no processo de transcrição, pela interação direta da aflatoxina-epóxido com o DNA, ou
- na interação com a RNA polimerase (enzima que catalisa a síntese do RNA a partir do DNA).

A aflatoxina possui alta afinidade por ácidos nucleicos, particularmente pelo ponto nucleofílico da *guanina* localizada no (*N*). A formação do complexo aflatoxina-ácido nucleico (ligação co-valente) acarreta diferentes efeitos biológicos. A ativação da AF-B₁ pela formação do epóxido e a subsequente ligação co-valente com o DNA são consideradas o primeiro estágio da carcinogênese. O principal produto

conjugado, inicialmente formado pela interação *aflatoxina-DNA* e identificado como *AFB₁-N⁷-guanina* (Figura 7.6), é transformado espontaneamente pela hidrólise do anel imidazol para *AFB₁-FAPI* (*N⁵-formil-2,5,6-triamino-4-oxo-N⁵-pirimidil*)-9-hidroxi-aflatoxina-*B₁*. Esta é a forma persistente do DNA conjugado que se acumula no fígado.

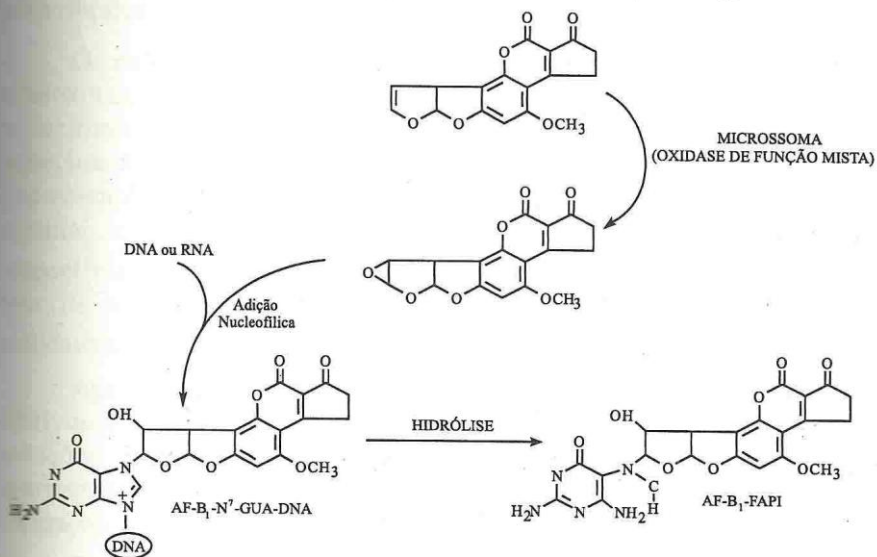


Figura 7.6 - Interação da AFB₁ com ácidos nucleicos.

Interação Aflatoxina-Proteínas

Após a formação da aflatoxina B₁-epóxido, esta pode ser hidrolisada para *AFB₁-diiodiol* (Figura 7.7), a qual, em pH fisiológico, forma híbridos ressonantes. Os grupos aldeídos formados podem interagir com proteínas, através da formação de base de Schiff com os grupos amina livres, imobilizando enzimas vitais ao funcionamento celular.

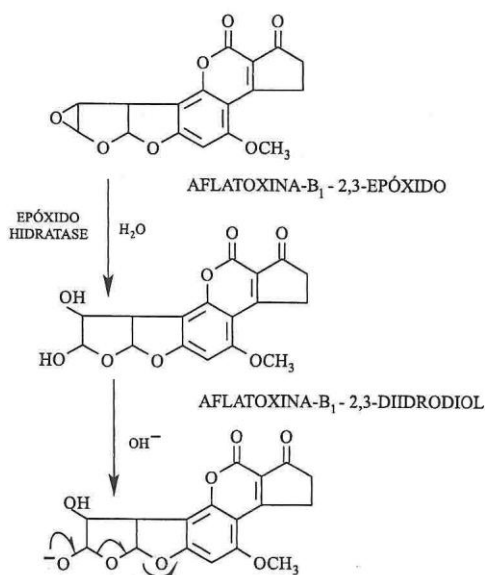


Figura 7.7 - Interação da AFB₁ com proteínas.

Estabilidade das Aflatoxinas

A contaminação de leite, carne e ovos é resultado do consumo de ração contaminada pelos animais. Nos animais em lactação, de 1,0 a 3,0% da aflatoxina B₁ ingerida é transformada, algumas horas depois, em seu derivado hidroxilado, denominado aflatoxina M₁, encontrada no leite (ligada à caseína). Com a precipitação de caseína durante a fabricação de queijo, ocorre também a concentração da aflatoxina no produto final (Tabela 7.2).

Tabela 7.2 - Concentração da aflatoxina (queijo/leite)

Tipo	Queijo/leite
Muçarela	8,1 : 1,0
Parmesão	5,8 : 1,0
Cheddar	4,3 : 1,0
Brick	1,7 : 1,0

A exposição da aflatoxina à luz ultravioleta provoca sua degradação parcial. O tratamento de amendoim contaminado com UV não tem efeito, mas, do leite contendo aflatoxina M_1 , a destruição é quase total. A adição de pequena quantidade de água oxigenada ao leite (0,05%) aumenta a eficiência da destruição, e a combinação da luz ultravioleta com riboflavina elimina grande parte do princípio ativo da aflatoxina M_1 .

O calor pode ser utilizado para inativar completamente as aflatoxinas, desde que alcançado o ponto de fusão (237-289 °C). Tal aquecimento é inaceitável no processamento de alimento, entretanto o aquecimento em temperatura menor reduz a toxicidade das aflatoxinas. Por exemplo, é prática comum torrar amendoim (150 °C/30 min), e isto diminui a atividade das aflatoxinas B_1 e B_2 em 70 e 45%, respectivamente; para o leite, o mesmo tratamento térmico não reduz o teor de aflatoxina- M_1 . De modo geral, o calor não é um processo satisfatório para eliminar aflatoxinas dos alimentos.

Agentes oxidantes como água oxigenada e hipoclorito de sódio são efetivos para reduzir o teor de aflatoxinas. Mas a utilização de tais soluções é impraticável, uma vez que ocorre, além da destruição de nutrientes, *flavor*, cor, textura e propriedades funcionais do alimento, a formação de resíduos tóxicos.

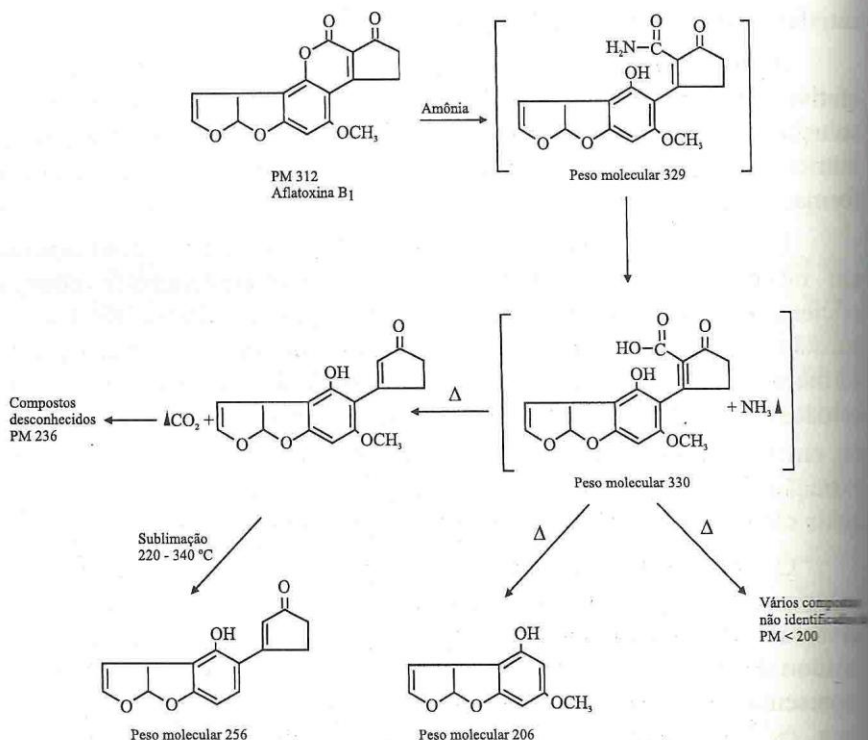
Em condições adequadas (Tabela 7.3), o tratamento com amônia em milho, amendoim e sementes de algodão contaminado elimina eficientemente a aflatoxina (eq. 7.1). A exposição destes produtos a substâncias alcalinas redundando na abertura do *anel lactona* e conseqüente formação de um sal. A adicional perda de amônia leva à formação de um cetoácido, que, pela descarboxilação, resulta na aflatoxina D_1 (não-tóxica) ou em sua decomposição para *benzofurano*. Em grãos utilizados para extração de óleo comestível, o produto final é isento de aflatoxinas, as quais são removidas durante o refino do óleo bruto com base (NaOH).

O tratamento com amônia promove alterações na proteína reduzindo os níveis de cistina, metionina e lisina, além de ocorrer desnaturação da proteína em razão do tratamento térmico/químico. O resíduo de amônia aumenta o nível de nitrogênio não-protéico, o que não representa problemas para os ruminantes, mas o mesmo não é desejável para os não-ruminantes. Alterações no amido e lipídios não são significativas.

Tabela 7.3 - Procedimento de descontaminação com amônia

Parâmetros	Processo	
	Pressão/temperatura elevada	Pressão/temperatura ambiente
Nível da amônia	0,2 - 2,0%	1,0 - 5,0%
Pressão	35 - 50 psi	Ambiente
Temperatura	80 - 120 °C	Ambiente
Duração	20 - 60 min	14 - 21 dias
Umidade	12 - 16%	12 - 16%

eq 7.1



Controle

A prevenção é a maneira mais eficiente de se controlar a contaminação. O conhecimento dos fatores que favorecem a produção de aflatoxinas é útil para minimizar o problema:

1 - *Temperatura* – a temperatura ideal para a produção de aflatoxinas encontra-se na faixa de 25-28 °C.

2 - *Umidade* – a umidade no substrato deve estar disponível para o fungo, e tal disponibilidade é expressa em atividade da água (a_w); o valor ótimo de a_w para produção de aflatoxina encontra-se na faixa de 0,93 a 0,98.

3 - *Disponibilidade do oxigênio* – fungos são aeróbicos, portanto oxigênio suficiente deve estar disponível para o crescimento e os processos biossintéticos associados.

4 - *pH do substrato* – afeta a produção da aflatoxina. Geralmente, a produção é favorecida em valores de pH na faixa de 3,4 a 5,5.

5 - *Substrato* – em geral, substrato com elevado teor de carboidrato é mais adequado, entretanto, fungos podem produzir aflatoxinas em substratos ricos em gordura e proteína. Aflatoxinas em amendoim e queijo, por exemplo, evidenciam esta afirmativa.

6 - *Interação microbiológica* – fungos produtores de aflatoxinas raramente se encontram como cultura pura no alimento, estando geralmente associados com bactérias, leveduras e outros fungos, que podem aumentar ou retardar a produção da aflatoxina.

Elas são encontradas mundialmente, sendo as regiões de temperatura e umidade elevadas as principais áreas de ocorrência. Os métodos atuais de processamento, bem como as práticas agrônômicas, não eliminam ou previnem completamente as aflatoxinas em alimentos. O fator mais importante na produção da aflatoxina é a umidade; portanto, a secagem rápida do produto imediatamente após a colheita e seu posterior armazenamento em condições apropriadas minimizam a contaminação.

Uma vez o produto contaminado, pode-se utilizar de diversas técnicas que poderão reduzir a contaminação, como remoção de grãos descoloridos e danificados, embora a contaminação possa estar em grãos

aparentemente livres de fungos visíveis; remoção de grãos que exibem fluorescência via procedimento eletrônico; e injeção de ar (processo pneumático) para tirar os grãos mais leves infectados por fungos. Os limites aceitáveis legalmente encontram-se transcritos na Tabela 7.4.

Tabela 7.4 - Níveis aceitáveis de aflatoxinas em diversos produtos agrícolas

Produto	Níveis (ng/g)
1 - Todos os produtos, exceto leite, para consumo humano	20
2 - Leite	0,5
3 - Milho para animais novos e vaca em lactação	20
4 - Milho para suínos e aves adultos	100
5 - Milho para suínos em fase de acabamento	200
6 - Milho para gado em fase de acabamento	300
7 - Torta de algodão (ingrediente para ração)	300
8 - Outros produtos para ração animal (exceto milho)	20

Aflatoxinas: Extração, Purificação e Separação

Reagentes

- Metanol-água (80+20), éter, etanol e acetona.
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,61 M, CHCl_3 , hexano e éter.
- Celite.

Procedimento

A - Extração

- 50 g de milho moído em béquer.
- Adicionar 200 ml da mistura metanol-água (80 + 20).
- Agitar/15 min; filtrar em proveta e coletar 100 ml.

- Transferir 75 ml do filtrado para o béquer.
- Adicionar 75 ml de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,61 M e 5 g de celite 545; agitar/2 min.
- Filtrar em proveta e coletar 100 ml.
- Transferir para o funil de separação e adicionar 5 ml de CHCl_3 . Agitar e coletar em tubo de ensaio a fração orgânica; repetir a adição do CHCl_3 .
- Concentrar a amostra em nitrogênio, dissolver com 0,5 ml de CHCl_3 (vórtex) e adicionar 0,5 ml de hexano.

B - Purificação: minicoluna de SEP-PAK (sílica-gel)

- Lavar a minicoluna SEP-PAK com 5 ml de hexano e transferir a amostra para a minicoluna.
- Lavar o tubo de ensaio com CHCl_3 -hexano (0,5 ml) e transferir para a coluna.
- Lavar a coluna com 5 ml de hexano e, posteriormente, com 5 ml de éter; descartar os solventes.
- Lavar a coluna com 5 ml de CHCl_3 : EtOH (95+5) e coletar.
- Concentrar a amostra em nitrogênio com aquecimento (banho-maria).
- Dissolver o resíduo em 0,5 ml de CHCl_3 .

C - Cromatografia

- Cromatografar em placas de sílica-gel, utilizando-se a fase móvel: CHCl_3 - acetona (9 + 1).
- Aplicar os padrões e a amostra, e determinar seus valores de R_f após visualizá-los em luz UV 365 nm.

CONSERVANTES QUÍMICOS

Introdução

Os alimentos, sejam de origem animal, sejam de origem vegetal, em certa fase de desenvolvimento, atingem um estágio considerado ótimo para consumo. Após a colheita e, ou, o abate, as perdas que se verificam em produtos armazenados são resultantes da ação de *microrganismos* e *processos químicos indesejáveis*.

As substâncias químicas com propriedades antimicrobiológicas adicionadas aos alimentos, processados ou não, são denominadas *conservantes*, cuja função no alimento é inibir o crescimento e, ou, desenvolvimento de microrganismos, prolongando a vida útil do produto e garantindo seu consumo com segurança. A adição de conservantes aos alimentos em concentrações aceitáveis promove a inibição dos microrganismos, até que sejam eliminados por volatilização, metabolismo, degradação ou por meio de interações químicas com outros componentes do alimento.

Processos físicos de controle como desidratação, armazenamento em baixas temperaturas (refrigeração, congelamento) e processamento térmico (pasteurização, esterilização) são os mais utilizados na preservação de alimentos. A aplicação desses processos é limitada para certos tipos de produtos. As alterações na identidade do alimento, o requerimento de energia do processo e a disponibilidade tecnológica são fatores limitantes na utilização dos processos físicos. Portanto, em várias situações tais procedimentos não são adequados e, para esses casos, o uso específico de substâncias químicas com propriedades antimicrobiológicas pode apresentar efeitos similares.

Tratamento Térmico

Branqueamento: tratamento térmico moderado utilizado para inativar enzimas oxidativas em frutas e vegetais. Esse processo é importante se os vegetais são adicionalmente processados (secagem, congelamento ou enlatamento), evitando sua deterioração durante o armazenamento. Em contraste, vegetais minimamente processados ou desidratados, geralmente não são pré-branqueados. Frutas e vegetais são imersos em água quente (88 a 99 °C) ou expostos ao vapor. É aplicado em vegetais antes do enlatamento ou congelamento. Dependendo do método, perde-se mais de 40% de vitaminas hidrossolúveis e minerais, 35% de açúcares e 20% de proteína.

O tempo de branqueamento utilizado para a maioria dos vegetais é de 1 a 5 minutos (água quente ou vapor). O efeito térmico promove a inativação de enzimas, como polifenol oxidase, catalase, peroxidase, lipóxigenase e clorofilase (Tabela 8.1). Assim como promove a desativação de enzimas, o branqueamento também promove redução no número de microorganismos, além de remover gases de dentro dos tecidos vegetais.

Tabela 8.1 - Ação de certas enzimas na qualidade de frutas e vegetais

Enzima	Ação
Polifenoloxidase	Catalisa oxidações de fenóis, resultando na formação de polímeros escuros (cap. 10)
Poligalacturonase	Catalisa hidrólise de ligações glicosídica entre o ácido poligalacturônico adjacente da pectina; resulta no amolecimento do tecido.
Pectinesterase	Catalisa a desesterificação de galacturonas em pectina; resulta no endurecimento do tecido.
Lipoxigenase	Catalisa oxidações de lipídios; resulta na formação de sabor e odor estranho (cap. 1)
Ác. ascórbico oxidase	Catalisa oxidação do ácido ascórbico; resulta em perdas da qualidade nutricional.
Clorofilase	Catalisa a remoção do anel fitol da clorofila; resulta na perda da coloração verde.

Tabela 8.2 - Objetivos da pasteurização e condições para alguns produtos

Alimento	Propósito	Condições de processamento
Suco de frutas	Inativ. enzimas (pectinesterase e poligalacturonase)	88 °C/15seg
Cerveja	Destruição de leveduras	65-68 °C/20 min em garrafas
Leite	Destruição de patógenos	71,5 °C/15seg
Ovo líquido	Destruição de patógenos	64,4 °C/2,5 min
Sorvete	Destruição de patógenos	80 °C/15seg

Esterilização: tratamento térmico mais severo aplicado ao alimento que será acondicionado a vácuo em latas, vidros e plástico, com o propósito de destruir microorganismos com a aplicação de calor sob pressão, seguido de rápido resfriamento em água. A temperatura e o tempo utilizados variam com o tamanho da partícula, as características do produto e suas propriedades de transferência de calor.

Alimentos de baixa acidez (Apêndice 7) são processados à temperatura elevada (115 a 125 °C) enquanto alimentos ácidos podem ser processados a 100 °C ou menos. O objetivo do processo é destruir o *C. botulinum* e seus esporos.

Congelamento: microorganismos não se desenvolvem em congelamento. O sabor e o odor característico dos alimentos congelados são devidos à inativação de enzimas pelo branqueamento. Os procedimentos mais utilizados consistem em testar as atividades de enzimas residuais, como a catalase, peroxidase e lipoxigenase, no alimento branqueado.

Desidratação: consiste na remoção de água do alimento, sendo realizada pelo contato do alimento com ar quente forçado ou pela secagem ao sol. Os microorganismos não se desenvolvem se o teor de umidade é reduzido para uma faixa segura, que varia com a composição química do alimento. O princípio é controlar a atividade da água (a_w) no produto final, restando as qualidades sensoriais e a estabilidade no armazenamento do produto desidratado.

A maioria dos produtos é estável do ponto de vista de microorganismos se a_w for igual ou menor que 0,60 (Figura 1.28). A atividade da água é uma medida da umidade livre no produto. É

determinada dividindo-se a pressão de vapor da substância pela pressão de vapor da água pura na mesma temperatura.

Seleção de Conservantes para Alimentos

A qualidade do alimento pode ser afetada por processos químicos, físicos e microbiológicos. Estima-se que 20% dos alimentos produzidos no mundo são perdidos devido à ação de microorganismos. Deve se ressaltar que a utilização de conservantes químicos não substitui as boas práticas de sanitização. Em concentrações, nenhum dos conservantes é letal para os microorganismos presentes no alimento, portanto não reduzem a contaminação, mas retardam o crescimento dos organismos. Produtos preparados em condições sanitárias inadequadas não serão beneficiados com a utilização dos conservantes, que são ineficientes em produtos contaminados. Os agentes microbiológicos comumente utilizados em alimentos são:

- 1 - Ácido benzóico e benzoato de sódio
- 2 - Metil e propil p-hidroxibenzoato nome comercial: Paraben
- 3 - Propionato de sódio e propionato de potássio
- 4 - Ácido sórbico e sorbato de potássio
- 5 - Sulfitos
- 6 - Nitritos
- 7 - Óxido de etileno/propileno

Nenhum dos tipos de conservantes químicos por si só é utilizado em todo o tipo de alimento. As propriedades físicas e químicas do conservante e a sua relação com o alimento constituem o principal fator na sua eficiência. Propriedades como solubilidade, pK_a (constante de dissociação), níveis tóxicos e reatividade química devem ser consideradas na escolha do conservante. A atividade antimicrobiológica dos ácidos fracos é atribuída à sua forma não-dissociada, portanto o pK_a é utilizado na predição de sua eficiência no alimento em determinado pH.

Diferentes compostos de uma mesma classe podem diferir na atividade antimicrobiológica, bem como nas suas propriedades física e química. Frequentemente, a forma salina dos ácidos orgânicos é mais

solúvel em água, sendo a forma preferida para situações em que a solubilidade em água é importante (*spray*, salmoura). Para aplicações diretas no produto, a forma de ácido pode ser a mais útil. O processamento térmico ou a desidratação do produto para diminuir a atividade da água (*aw*) aumenta a eficiência do conservante, diminuindo, portanto, a concentração requerida.

Aplicação dos conservantes químicos

São incorporados diretamente no alimento (imersão, *spray*, gás, injeção) ou oriundos, durante o processamento (fermentação), do alimento. Diferentes tipos de conservantes químicos são empregados: ácidos e derivados, sulfito, nitrato/nitrito, fumaça etc. A utilização depende do tipo de alimento, método de processamento, armazenamento e microrganismo envolvido.

Mecanismo de Inibição dos Ácidos e Derivados

O pH ácido facilita a destruição de microrganismos pelo calor, permitindo que se utilize tempo menor de esterilização e pasteurização e, portanto, minimizando os efeitos negativos na qualidade do produto.

O efeito antimicrobiológico dos ácidos utilizados como conservantes está relacionado com a forma não-dissociada: *a concentração é determinada pelo pK_a do ácido e do pH do meio* (eq. 8.2). Como ilustrado na Tabela 8.3, os valores de pK_a (pH no qual 50% da molécula se encontra na forma dissociada) da maioria dos ácidos encontram-se na faixa de pH entre 3,0 e 5,0; portanto, a concentração da forma não-dissociada aumenta com a elevação da acidez do alimento, ou seja, o pH do alimento deve ser menor que o pK_a , de forma a garantir alta concentração da forma não-dissociada.

Tabela 8.3 - Proporção (%) do total do ácido não-dissociado em diferentes pH

			pH				
		pKa	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0
Ácido cítrico	3,13	4,76	6,40	53,0	18,9	0,41	0,006
Ácido benzóico		4,20		93,5	59,3	12,8	1,44
Ácido propiônico		4,87		98,5	87,6	41,7	6,67
Ácido sórbico		4,80		97,5	82,0	30,0	4,10
Paraben		8,47		99,9	99,9	99,9	99,9

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{\text{A}^-}{\text{HA}} \quad \text{HA: forma não-dissociada} \quad \text{eq. 8.2}$$

A⁻: forma dissociada

Na faixa de pH entre 5,0 e 6,0, os ácidos orgânicos são relativamente ineficientes, à exceção dos parabens, que permanecem na forma não-dissociada, sendo, portanto, efetivos inibidores. Acredita-se que a forma não-dissociada do conservante químico penetra através da membrana, tornando-se ionizado após alcançar o interior da célula. A concentração intracelular desses ácidos orgânicos altera o funcionamento normal do gradiente envolvido no sistema de transporte da membrana celular.

Além do pKa, a aplicação e a eficiência de certos conservantes são afetadas pelo comprimento da cadeia de carbono e pelo grau de insaturação. A atividade antimicrobiológica dos ácidos orgânicos geralmente aumenta com o comprimento da cadeia, mas a limitada solubilidade em água desses ácidos restringe o seu uso.

Acidulantes

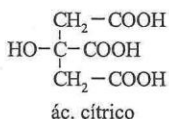
São empregados para alterar o *flavor* conferindo agradável sabor ácido, além de simplificar certas operações de processamento. A adição

de acidulantes diminui a resistência de bactérias ao calor pela diminuição do pH, portanto menos tempo será necessário para esterilizar o produto. Os ácidos orgânicos possuem este efeito em pH maior que o dos inorgânicos, indicando que a forma não dissociada do ácido tem participação na destruição de microorganismos em temperaturas elevadas. Os mais utilizados são: cítrico e fosfórico

Ácido cítrico: encontrado naturalmente em frutas cítricas, tomates e diversas outras frutas e vegetais (eq. 8.3). Suas características úteis incluem ótima solubilidade em água, baixa toxidez, habilidade de complexação com metais e agradável sabor ácido. As bebidas são as maiores consumidoras de ácido cítrico. É também utilizado em produtos enlatados: para abaixar o pH, portanto, reduzindo o requerimento do processamento térmico; otimizar o *flavor* de frutas enlatadas; e complexar traços de íons metálicos capazes de catalisar reações de oxidação (cap. 1).

É um ácido tribásico com quatro grupos ionizáveis (Tabela 8.3). O grupo alfa carboxila em relação ao grupo hidroxila é ionizado primeiro, seguido dos dois grupos carboxilas terminais e, finalmente, do grupo hidroxila ($pK=11,0$). É agente microbiológico menos efetivo que os outros ácidos, em razão de ser metabolizado por vários microorganismos.

eq. 8.3



Ácido fosfórico: é um ácido inorgânico e o mais forte utilizado como acidulante em alimentos. As bebidas carbonatadas são a maior consumidora. Em queijos e cerveja é utilizado para ajustar o pH e para neutralizar a soda cáustica utilizada no descascamento de frutas.

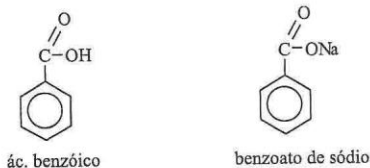
Ácido benzóico e derivados

O ácido benzóico ocorre na natureza, na forma glicosídica, em diversas frutas e vegetais. Sua atividade ótima está situada na faixa de pH entre 2,5 e 4,0 (Tabela 8.3). É utilizado no controle de fungos e leveduras, mas seu uso não é recomendado para controle de bactérias, em face de sua baixa atividade em pH igual a 4,5 ou maior. A maior

solubilidade em água e a não-interferência na coloração tornam o benzoato de sódio o mais utilizado (eq.8.4).

São utilizados em bebidas carbonatadas, sucos de frutas, geléias e margarinas. O pK do benzoato é 4,2, e em pH = 4,0, 60% do composto se encontra não-dissociado; em pH = 6,0, somente 1,5% está não-dissociado. Isto restringe a aplicação do ácido benzóico e seus sais em produtos com baixa acidêz.

eq. 8.4

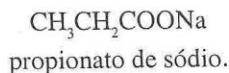
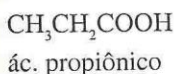


Ácido propiônico e derivados

O ácido propionico e seus sais (eq. 8.5) são permitidos em pães, bolos, certos tipos de queijos e outros produtos, como inibidor de fungos. O seu modo de ação é similar ao dos sorbatos e benzoatos. O pK do propionato é 4,87, e em pH = 4,0, 88% do composto se encontra na forma não-dissociada; em pH = 6,0, somente 6,7% permanece não-dissociado, portanto ativo em produtos com baixa acidez.

É pouco empregado pela indústria de alimentos em face de seu poder corrosivo, sendo seus derivados preferencialmente utilizados, pois liberam o ácido no meio. É encontrado naturalmente em certos tipos de queijo em nível de até 1,0%.

eq. 8.5



Ácido sórbico e derivados

O sorbato é um ácido graxo monocarboxílico, encontrado naturalmente em diversas frutas e vegetais, sendo metabolizado pelo organismo para dióxido de carbono e água. São efetivos no controle de

leveduras e fungos, sendo utilizados em níveis de até 0,2%. A forma ácida é mais solúvel em lipídios que em água (0,16 g/100 ml). Os derivados (sódio, potássio e cálcio) são frequentemente utilizados em razão da sua alta solubilidade em água. O ácido sórbico é metabolizado de forma idêntica à dos ácidos graxos de cadeia longa. (eq. 8.6).

A eficiência dos sorbatos se estende a uma faixa de pH até 6,5, portanto mais alto do que os benzoatos e propionatos e abaixo dos parabens. Exemplificando, em pH = 3,5 o ácido benzóico encontra-se 83% na forma não-dissociada, comparada a 95% do ácido sórbico. Em pH = 5,5 somente 4,7% do ácido benzóico é ativo, comparado a 15% do ácido sórbico. Portanto, são mais efetivos que os benzoatos na faixa de pH entre 4,0 e 6,0. Aplicações tradicionais dos sorbatos incluem queijos, produtos de panificação, sucos, bebidas, xaropes, vinhos, geléias, pickles e molho para saladas.

eq. 8.6



ác. sórbico



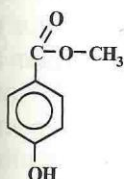
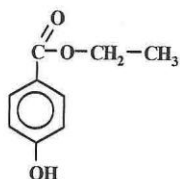
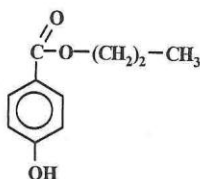
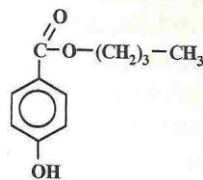
sorbato de potássio

Ésteres do ácido p-hidroxibenzoico (parabens)

São ésteres alquila do ácido para-hidroxibenzoico utilizado como conservantes e são estruturalmente parecidos com o benzoato. Diferentemente dos outros três principais conservantes, não são ácidos fracos e, em razão do grupo carboxila esterificado, a forma ativa não-dissociada é retida ao longo da faixa do pH. A atividade antimicrobiológica dos parabéns é diretamente proporcional ao comprimento da cadeia lateral, mas a solubilidade diminui com o aumento da cadeia (0,25% para o éster metílico). Frequentemente, a combinação do éster metil e propil é utilizada. São efetivos no controle de fungos e leveduras e relativamente ineficientes no controle de bactérias.

Em contraste com os outros tipos de conservantes, mostram-se ativos em ampla faixa de pH (Tabela 8.3), aparentemente em razão de permanecerem na forma não-dissociada. A ligação éster é estável à hidrólise em temperatura de esterilização (eq. 8.7). São aplicados na forma de solução alcalina, etanólica ou em propileno glicol em concentrações de 0,3-0,06%.

eq. 8.7

paraben
metilaparaben
etilaparaben
propilaparaben
butila

Fumaça

A fumaça formada a partir da queima da madeira, além de contribuir com o *flavor*, possui efeito conservante através do calor, da desidratação e introdução de seus componentes químicos (compostos fenólicos, formaldeído, ácido acético e creosoto) no produto. Esses componentes não são devidamente conhecidos. Dentre esses, o benzopireno é o principal, com atividade toxicológica relevante (cap. 6).

A fumaça oriunda de diferentes tipos de madeira difere em eficiência antimicrobiológica, aparentemente em razão de sua composição diferenciada. O efeito de esporos de bactérias e fungos são resistentes e se manifesta na superfície do produto.

Gases

A maioria dos agentes antimicrobiológicos exibe efeito inibidor e não letal no alimento. Entretanto, ocorre exceção com o *óxido de etileno* e *propileno*. Esses esterilizantes químicos são utilizados no tratamento de certos produtos que contêm baixo teor de umidade e para esterilizar embalagens. Para obter contato íntimo com os microorganismos os epóxidos são utilizados na forma de vapor. Após exposição adequada, o epóxido residual é removido por meio de ventilação.

Epóxidos

Utilizado em especiarias com a finalidade de reduzir a população microbiana e infestação de insetos, o resíduo de até 50 ppm no

produto final é aceitável. O seu poder esterilizante está relacionado com a capacidade de reagir com proteínas, incluindo os grupos carboxila, sulfidril, amina e hidroxila, alterando a estrutura da proteína de insetos e microorganismos. Apesar de seu efeito esterilizante, é muito tóxico para a espécie humana na concentração encontrada nos vapores utilizados na esterilização. Em razão disso, muitos países restringem a sua utilização em alimentos. O óxido de etileno não permanece no alimento por muito tempo em razão do seu baixo ponto de ebulição ($\sim 10^\circ\text{C}$).

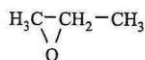
O óxido de propileno é também utilizado com o mesmo propósito, mas não é efetivo como o óxido de etileno. Os epóxidos (óxido de etileno e propileno) são ésteres cíclicos altamente reativos, que destroem todas as formas de microrganismos. O efeito esterilizante ocorre em razão da alquilação de proteínas, de ácidos nucleicos e de outros compostos orgânicos (eq. 8.3).

eq. 8.3



ÓXIDO DE ETILENO

P.E. = $13,2^\circ\text{C}$



ÓXIDO DE PROPILENO

P.E. = $34,2^\circ\text{C}$

A sua aplicação é restrita em razão da elevada toxidez. Concentrações entre 0,1 e 0,2 g de óxido de etileno/l ar são letais para a espécie humana. Os produtos de degradação do óxido de etileno incluem o etileno glicol e a cloridrina e os do óxido de propileno, o propileno glicol.

A formação potencial de cloridrina relativamente tóxica como resultado da reação entre os epóxidos e cloretos inorgânicos (Figura 8.1) é motivo de preocupação, além do efeito adverso sobre vitaminas, como a riboflavina, niacina e piridoxina. Esses óxidos existem na forma de gases, sendo utilizados como fumigantes na indústria de alimentos em produtos com baixo teor de umidade e sensíveis à temperatura (frutas desidratadas, amidos, farinhas, cereais, especiarias) de câmaras fechadas. Posteriormente, são removidos do alimento pela evacuação do ar com ligeiro aquecimento da câmara. Os glicóis remanescentes não são tóxicos.

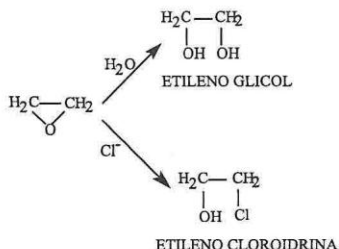


Figura 8.1 - Reação do óxido de etileno com água e cloreto.

Sulfito

O dióxido de enxofre é um dos aditivos de uso mais freqüente na indústria de alimentos. O termo sulfito refere-se ao dióxido de enxofre (SO_2) e a diversas formas de sulfitos inorgânicos que o liberam nas condições de uso. São adicionados em alimentos por diversas e importantes razões técnicas, dentre as quais: controle do escurecimento enzimático e não-enzimático; ação antimicrobiana; e como agentes antioxidante, redutor e clarificante.

Os sulfitos representam o grupo de compostos que incluem dióxido de enxofre (SO_2), sulfito de sódio (Na_2SO_3), bissulfito de sódio (NaHSO_3) e metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), comumente utilizados como agentes antimicrobiológicos e no controle do escurecimento de frutas e vegetais. Possuem fracas propriedades antioxidantes, são usados como removedores de oxigênio. Em geral, são adicionados em excesso (1,5 mol/0,5 mol de O_2) para garantir a completa e acelerada remoção do oxigênio. Apesar de sua ampla utilização em alimentos, sua aplicação é questionada devido aos efeitos adversos em indivíduos alérgicos e asmáticos.

O sulfito reduz a destruição do caroteno e do ácido ascórbico; reage com o oxigênio molecular, formando sulfato; inibe numerosas enzimas, incluindo a polifenoloxidase, a lipoxigenase e a ascórbico-oxidase. É também efetivo na inibição do escurecimento não-enzimático, reagindo com carbonilas intermediárias e, desse modo, prevenindo sua participação na reação que leva à formação de pigmentos escuros.

Os sulfitos são utilizados em batatas pré-descascadas e fatiadas e cogumelos frescos. Previnem a oxidação do ácido ascórbico pela enzima ascorbato-oxidase e outras enzimas. São efetivos na prevenção da formação de *flavor* estranho em ervilhas desidratadas e outros vegetais, inibindo a enzima lipoxigenase. Em cerveja, o sulfito inibe alterações oxidativas, consideradas indesejáveis no desenvolvimento do *flavor*. Frutas secas ao sol são previamente expostas à fumaça oriunda da queima de enxofre. Maçãs são tratadas com solução de sulfito antes da desidratação.

Na fabricação de vinho, o sulfito é utilizado em diferentes estádios: na desinfecção do equipamento antes da fermentação e no tratamento do mosto para eliminar a flora microbiana natural, além de preservar os constituintes sensíveis à oxidação e evitar o escurecimento enzimático via oxidação de fenóis. Durante a fermentação, o dióxido de enxofre é utilizado como seletor de leveduras e antimicrobiano e, durante a estocagem, evita alterações pós-fermentação por microorganismo. As leveduras são mais resistentes ao sulfito que a maioria dos fungos e bactérias. A forma não-dissociada possui ação germicida. Com $pK = 1,81$, há pouca atividade em produtos com pH acima de 3,5. As leveduras são mais resistentes ao sulfito que a maioria dos fungos e bactérias.

Soluções variando de 0,20 a 0,50% (SO_2) são preparadas com sulfito de sódio e bissulfito de sódio em partes iguais. As soluções são menos eficientes que a queima do enxofre, em razão de sua baixa penetração, além das perdas por lixiviação de açúcares, ácidos e componentes do *flavor*.

A análise do resíduo de sulfito em alimentos é complicada pelo fato de ocorrerem rápidas interações entre o sulfito e os vários componentes do alimento. O sulfito reage prontamente com *açúcares redutores*, *aldeídos*, *cetonas*, *antocianinas* e *proteínas*, formando uma grande variedade de sulfitos orgânicos combinados. A extensão da reação é dependente de pH, temperatura, concentração de sulfito e componentes reativos presentes no produto. Em face da rápida reação do sulfito com os componentes do alimento, espera-se encontrar muito pouco sulfito livre no produto no momento do consumo.

Como fortes agentes redutores, os sulfitos podem ser incorporados aos alimentos na forma de gás ou de sais de sulfito, bissulfito ou metabissulfito (Tabela 8.4), os quais liberam o sulfito nas condições de

uso. A forma de gás do dióxido de enxofre é utilizada na preservação de frutas e vegetais desidratados, enquanto as soluções de sulfito são empregadas em alimentos líquidos.

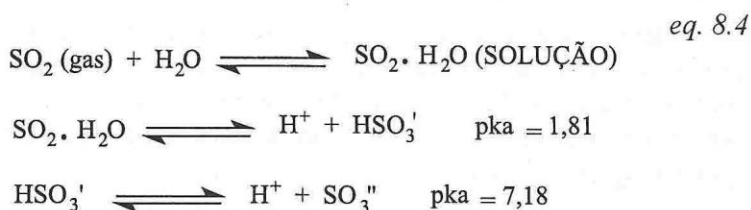
Sulfitos podem ser encontrados em alimentos mesmo sem serem adicionados, em virtude da redução microbiológica do SO_4^{2-} para o SO_3^{2-} . Perdas podem ocorrer por exposição ao ar, oxidação para SO_4^{2-} e cozimento.

Tabela 8.4 - Rendimento teórico dos agentes de sulfitação

Nome	Fórmula	$\text{SO}_2(\%)^*$
Dióxido de enxofre	SO_2	100
Sulfito de sódio anidro	Na_2SO_3	50,82
Sulfito de sódio, heptaidratado	$\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	25,41
Bissulfito de sódio	NaHSO_3	61,56
Metabissulfito de sódio	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	67,39
Metabissulfito de potássio	$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$	57,60
Bissulfito de potássio	KHSO_3	57,32

* **Rendimento teórico**, praticamente não obtido em aplicações em alimentos: reação com componentes do alimento, volatilizado para atmosfera ou oxidado para sulfato.

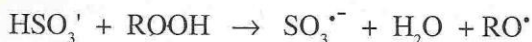
Os vários sais, assim como o dióxido de enxofre, quando dissolvidos em água, resultam em uma mistura de íons sulfito e bissulfito, sendo a proporção relativa de cada forma dependente do pH do meio, da força iônica e da concentração (eq. 8.4). Dessa maneira, a escolha da forma química para sulfitar alimentos é uma questão de conveniência, já que todas as formas são quimicamente equivalentes.



Na faixa normal de pH dos alimentos (3-7), a forma predominante será HSO_3' . Aumentando a força iônica, reduz-se o pK e o íon SO_3^{2-} deverá,

portanto, estar presente em maior proporção. A espécie HSO_3' é sensível à oxidação pelo hidroperóxido, formando radicais livres (eq. 8.5):

eq. 8.5



Embora o radical alcóxil ($\text{RO}^{\cdot}$) formado seja muito reativo com as substâncias orgânicas, o ânion radical $\text{SO}_3'^{\cdot-}$ apresenta reatividade moderada, embora possa formar ácidos sulfônicos por adição de compostos insaturados, oxidar o ascorbato ou ser rapidamente oxidado pelo oxigênio molecular, formando o ânion radical $\text{SO}_3'^{\cdot-}$ muito reativo. Em solução, as formas predominantes podem ser assim resumidas:

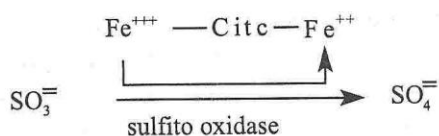
- 1- pH = 7,0, as duas formas (HSO_3' e SO_3'') estão presentes em proporções aproximadamente iguais.
- 2 - pH = 4,5, predominam as formas HSO_3' e $\text{SO}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$.
- 3 - pH = 3,0, o íon bissulfito é protonado, e a forma predominante é $\text{SO}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$.

Portanto, o dióxido de enxofre é mais efetivo como agente antimicrobiano em meio ácido. Em pH < 4,5, o íon bissulfito (HSO_3') e o $\text{SO}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ (ác. forte) são as formas predominantes e, possivelmente, as formas ativas no controle de fungos, leveduras e bactérias. Em pH alto, o bissulfito (HSO_3') inibe *bactérias*, mas não *leveduras*. Em razão de sua alta reatividade (interage com diversos componentes celulares), o mecanismo preciso de inibição microbiana não é conhecido.

Além das propriedades antimicrobianas, o dióxido de enxofre é efetivo inibidor da reação de escurecimento não-enzimático. O mecanismo desta inibição provavelmente envolve a interação do sulfito com grupos carbonílicos ativos, impedindo a formação de pigmentos escuros (capítulos 10 e 11).

O sulfito livre é metabolizado para sulfato, do mesmo modo que o são os aminoácidos sulfurosos, ou seja, é oxidado pela enzima *sulfito:citocromo- c-oxirredutase* (eq. 8.6), localizada na mitocôndria, e excretado pela urina em indivíduos normais:

eq. 8.6



Alimentos contendo sulfito (Tabela 8.5) não devem ser consumidos pelos asmáticos (causa dores de cabeça e abdominais, náuseas, urticárias, tonteiras etc.). O sulfito não tem uso recomendado em alimentos considerados fonte de vitamina B₁, pois causa sua destruição.

Tabela 8.5 - Valores estimados de SO₂ (total) em produtos sulfitados (ppm)

Produto	SO ₂ (ppm)
Frutas secas	1200
Vinho	150
Suco de uva	85
Camarão	10-40
Xarope de milho	30
Amido de milho	30
Cogumelo	15
Batata desidratada	30-90
Vinagre	75

Nitrato/Nitrito

O nitrato (NO₃⁻) e o nitrito (NO₂⁻) são componentes naturais em alimentos, e seus níveis variam, dependendo da quantidade de nitrato disponível no solo e na água. O nitrato é absorvido do solo pelas plantas, sendo parte convertida em nitrito pela ação da enzima nitrato redutase presente nos vegetais, que permanece ativa mesmo após a colheita.

Assim, o armazenamento inadequado, em temperatura elevada e baixa circulação de ar, favorecem a conversão do nitrato em nitrito. Este é considerado potencialmente mais tóxico que o nitrato, uma vez que, em certas condições, interage com aminas secundária e terciária presentes

nos alimentos, formando as *nitrosaminas*, que são consideradas potencialmente carcinogênicas.

Os sais de potássio e o sódio de nitrito e nitrato são muito utilizados em mistura de cura de carnes para desenvolver e fixar a cor (reage com as proteínas do grupo heme), inibir microorganismos e desenvolver o *flavor* característico (inibe a oxidação). Quando adicionado em carnes processadas como presunto, salame, bacon, peixe defumado, carnes curadas enlatadas, seguidas de tratamento térmico, o nitrito apresenta efeito antibotulínico. Consiste na inibição do crescimento de células vegetativas e na prevenção da germinação e crescimento de esporos que podem sobreviver ao tratamento térmico ou defumação durante o armazenamento.

O nitrito, e não o nitrato, é aparentemente o constituinte funcional. O nitrito é convertido na carne para ácido nitroso, que é adicionalmente reduzido para óxido nítrico (NO), que reage com a mioglobina formando nitrosilmioglobina, pigmento responsável pela coloração vermelha em carne curada. Com o aquecimento, a nitrosilmioglobina forma o pigmento de coloração rósea denominado nitrosilmiocromo. Essas duas formas são similares, e a última apresenta a proteína (globina) desnaturada. A adição do ácido ascórbico aumenta a formação do óxido nítrico e protege o pigmento da carne curada da oxidação.

O nitrito desaparece com o aquecimento e o armazenamento. Diversos tipos de bactérias são capazes de utilizar o nitrato como receptor de elétron, reduzindo-o para nitrito. O íon nitrito é o mais importante dos dois na carne curada. Este é altamente reativo, sendo capaz de atuar como agente redutor e oxidante. Em meio ácido, ioniza-se formando o ácido nitroso (HNO_2), que se decompõe formando óxido nítrico (NO), importante para a fixação da cor em carnes curadas.

O óxido nítrico (NO) é também capaz de reagir com outros compostos contendo porfirina como catalase, peroxidases, citocromos e outros, contribuindo para seu efeito antimicrobiano. O aumento do efeito antibacteriano do nitrito aumenta com a diminuição do pH na faixa ácida, e este é acompanhado pelo aumento da forma não-dissociada (HNO_2). O nitrito possui $\text{pK} = 3,36$ e, conseqüentemente, na forma de ácido nitroso em baixo pH. O máximo da forma não-dissociada ocorre em pH 4,5-5,5, conseqüentemente, maior atividade antimicrobiológica. O pigmento da carne curada cozida é o dinitrosilferroemocromo, formado quando a globina da nitrosilmioglobina é substituída por um segundo grupo NO.

Atividade antimicrobiológica

O nitrito é o componente antimicrobiano que resulta na formação do ácido nitroso (HNO_2). Sua adição em carnes e peixes retarda o crescimento do *Clostridium botulinum* e a conseqüente produção da enterotoxina durante o armazenamento.

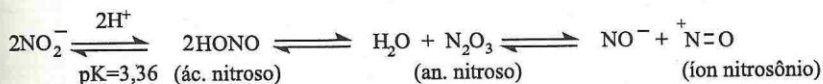
A eficiência bacteriostática está relacionada com o pH do alimento, que determina a concentração da forma não-dissociada do ácido nitroso, sendo mais eficiente em pH igual a 5,0 - 5,5 ou menor. Os sais de nitrito são solúveis em água, e o íon nitrito (NO_2^-) é a base conjugada do HNO_2 com $\text{pK}_a = 3,36$, havendo, portanto, em pH elevado ($\text{pH} > 5,5$), predominância da forma dissociada do ácido nitroso. Por exemplo: em $\text{pH} = 7,0$, serão necessários 3.500 ppm de NaNO_2 para se obter 1,0 ppm do HNO_2 e em $\text{pH} = 5,0$, serão necessários 40 ppm.

da acidez do alimento é importante na preservação e estabilidade microbiológica.

O nitrato não apresenta nenhuma atividade inibidora contra o *Clostridium botulinum*, mas sua ação é manifestada após sua redução a nitrito, por meio de microrganismos nos alimentos. O nitrito eventualmente desaparece como resultado de reações químicas com certos componentes do alimento, como proteínas e gorduras, porém a natureza exata dos produtos formados não é bem conhecida. Também, não reage diretamente com a amina, necessitando inicialmente ser convertido em anidrido nitroso (N_2O_3).

O ácido nitroso formado pela ação do ácido sobre o sal de nitrito é instável e decompõe-se em anidrido nitroso e íon nitrosônio (eq. 8.7).

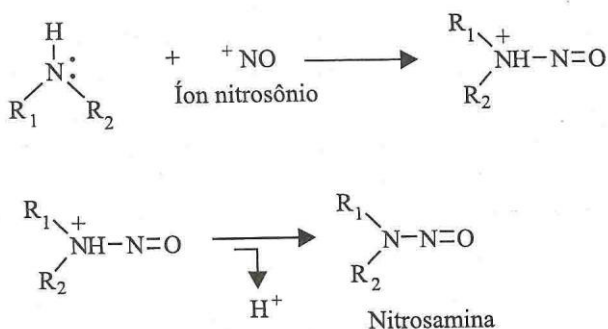
eq. 8.7



Na presença de aminas secundárias (R_2NH), o íon nitrosônio perde um próton, formando a nitrosamina (eq. 8.8). A velocidade de formação da nitrosamina depende do pH do meio e da basicidade da amina. Quanto

maior o pKa (ou seja, base forte) da amina, menor será a velocidade de formação da nitrosamina em virtude de sua protonação. Em pH baixo há a formação da amina protonada não-reativa, alterando o equilíbrio *nitrito* $\leftrightarrow$ *ácido nitroso* para a direita. Portanto, a reação de formação da nitrosamina ocorre mais facilmente em meio ácido (pH 3,0-3,5), próximo do pKa do ácido nitroso (pK = 3,36), e na presença de aminas básicas:

eq. 8.8



Nitrosaminas em produtos curados e seu controle

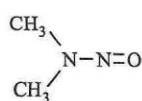
Diversas nitrosaminas identificadas em vários produtos (Tabela 8.6) são consideradas tóxicas, mutagênicas, teratogênicas, bem como carcinogênicas. São geralmente divididas em dois grupos principais: *derivadas de aminas secundárias* e *de amidas*. Esta última, por ser instável durante o processamento de alimento, é muito pouco provável de ser encontrada.

Tabela 8.6 - Ocorrência de nitrosaminas em alimentos

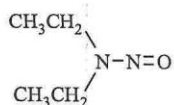
Produto	Nitrosamina	□ g/kg
Bacon	NPIR, DMNA	3,8 - 22,0
Salame	NDMA	10,0 - 80,0
Queijo*	NDMA	1,0 - 4,0
Peixe**	NDMA	4,0 - 26,0
Cachorro-quente	NDMA	0,0 - 84,0
Presunto	NPIR, NPPI	1,0 - 78,0

* Gorgonzola, Gouda, Cabra, Tilsiter.

** Defumado + Nitrito/nitrato.



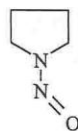
N-DMA



N-NDEA



NPIP



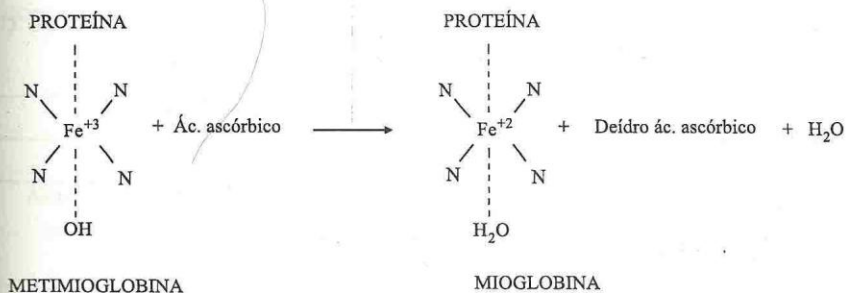
NPIR

NDMA: N-nitrosodimetilamina, NPIR: N-nitrosopirrolidina

NPIP: N-nitrosopiperidina, N-NDEA: N-nitrosodietilamina

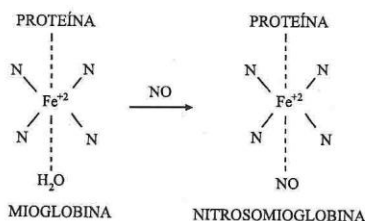
As nitrosaminas podem ser encontradas em baixo nível em carnes curadas, peixes e derivados. O isoascorbato possui efeito inibitório na formação de nitrosaminas. O seu efeito se verifica sequestrando o ferro, embora, sob certas condições, possa reduzir o nitrito eficientemente. A utilização dos ácidos ascórbico e isoascórbico (D-ascórbico e eritórbito) e respectivos sais em processamento de carne inibe a formação de nitrosaminas, além de conferir estabilidade à cor pela redução da metimioglobina para mioglobina e do nitrato para nitrito (eq. 8.9). O ácido ascórbico previne a formação indesejável do anidrido nitroso.

eq. 8.9



O nitrito na presença do ácido ascórbico forma o monóxido de nitrogênio (NO), que atua como agente de "cura" (eq. 8.10), além de inibir a oxidação. O NO reage parcialmente com oxigênio, formando o nitrato. Portanto, quando o ácido ascórbico é utilizado, o teor de nitrito diminui rapidamente, muito mais quando se emprega o ascorbato de sódio, em razão do pH elevado do meio:

eq. 8.10



O ascorbato ou o eritorbato atua também na redução do NO_2 para NO. O óxido nítrico reage com a mioglobina em condições redutoras, produzindo a pigmentação vermelha desejável, denominada nitrosilmioglobina (eq. 8.10). A maioria das misturas empregadas no processo de “cura” contém ascorbato de sódio (550 ppm). O ácido ascórbico não deve ser utilizado na solução de cura, pois seu baixo pH leva à formação de monóxido de nitrogênio (NO) e, com sua evolução para o ar, é convertido em gás dióxido de nitrogênio (NO_2), letal em níveis de 10 ppm no ar e irritante em dosagem menor. A adição do alfatocoferol também reduz a formação de nitrosaminas (Tabela 8.7), removendo os radicais livres $\text{NO}^\bullet$ e $\text{NO}_2^\bullet$ do processo de nitrosação (eq. 8.11).

Tabela 8.7 - Efeito do armazenamento a 20 °C sobre a eficiência do α -tocoferol na formação de nitrosaminas

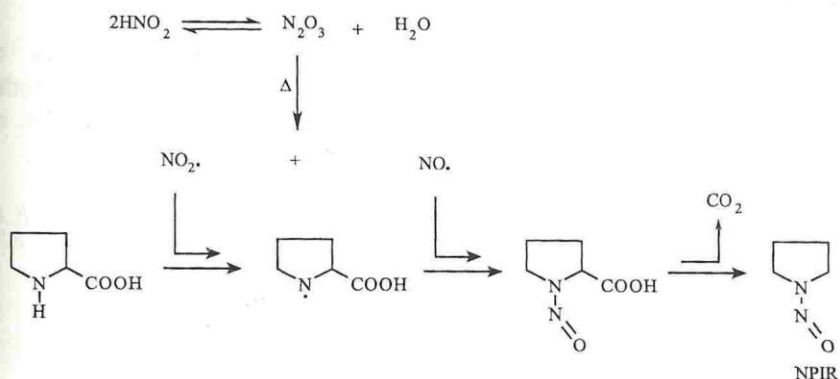
Tempo de armazenamento	Concentração de nitrosaminas ($\mu\text{g/kg}$)					
	Bacon (controle)		Bacon + α -tocoferol*		% inibição	
(Mês)	NPIR	DMNA	NPIR	DMNA	NPIR	DMNA
0	8,1	2,6	2,7	1,6	67	39
1	8,3	2,3	3,1	1,3	63	44
2	8,3	1,8	2,0	0,6	76	67
3	9,0	3,1	2,4	0,4	73	55

α -Tocoferol: 500 mg/kg produto final.

Alguns aminoácidos como *prolina*, *triptofano*, *cisteína*, *arginina* e *histidina*, na forma livre ou de peptídios, podem-se constituir em aminas ativas. Por exemplo, a nitrosopirrolidina (NPIR), encontrada em *bacon*, é formada em temperatura elevada ($>100^\circ\text{C}$). O anidrido nitroso (N_2O_3) dissocia-se em temperatura alta, formando os radicais ($\text{NO}^\bullet$) e ($\text{NO}_2^\bullet$). O

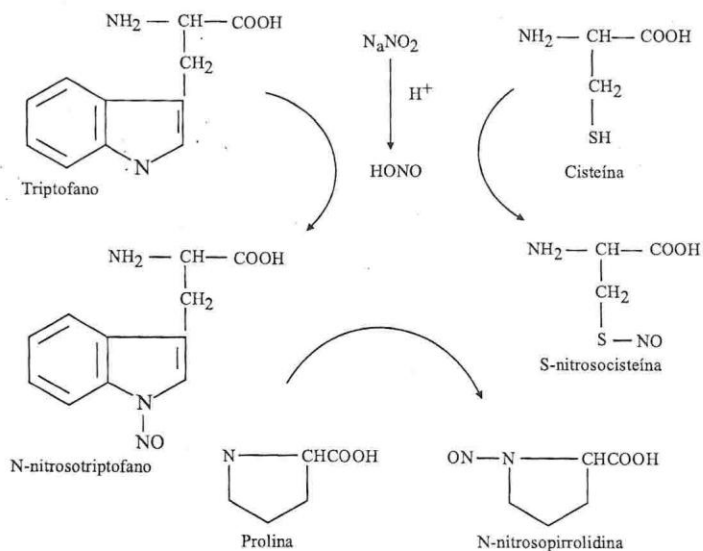
radical óxido nítrico ($\text{NO}_2^\bullet$) remove o próton amino da prolina (eq. 8.11), dando origem a um novo radical, que interage com o ($\text{NO}^\bullet$), formando a nitrosoprolina, que, após a descarboxilação, é convertida em nitrosopirrolidina.

eq. 8.11



De forma similar, os outros aminoácidos ou resíduos citados anteriormente podem também levar à formação de nitrosamina. A reação ocorre em meio ácido e temperatura elevada (eq. 8.12).

eq. 8.12

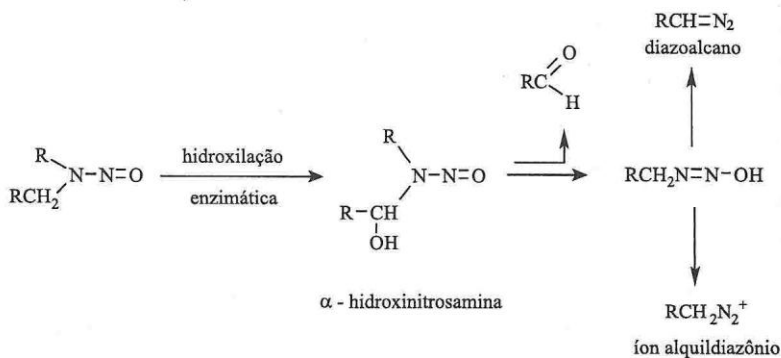


Metabolismo das nitrosaminas

Numerosas nitrosaminas testadas oralmente em animais experimentais produziram tumores em vários órgãos (fígado, cavidade nasal, rins e estômago). Entretanto, dosagem elevada, na faixa de mg/kg, foi utilizada muito acima dos níveis (ppb) encontrados normalmente em alimentos.

As nitrosaminas são hidroxiladas enzimaticamente para α -hidroxinitrosaminas, formando, posteriormente, intermediários oriundos da ruptura da ligação C-N, que são compostos eletrofílicos capazes de interagir co-valentemente com o DNA (eq. 8.13):

eq. 8.13



Sulfito: Determinação e Quantificação

Reagentes

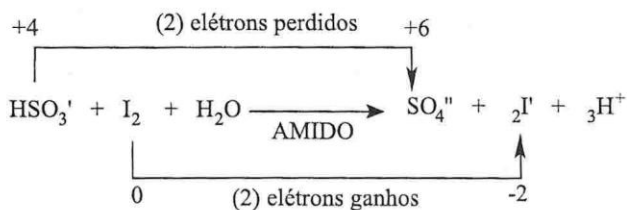
- Na_2CO_3 , H_2SO_4 e I_2 0,02 N.
- Amido 1,0%, NaOH 1 N, HCl 6 N.
- Formaldeído 40,0%, tampão tartarato de sódio 0,5 M, pH=4,5.

Procedimento

O método de titulação direta envolve a oxidação do SO_3^- para SO_4^- pelo I_2 (eq. 8.14), e o teor de SO_2 ou SO_3^- pode ser calculado a partir do

equivalente do I_2 usado na reação de oxidação. A amostra é titulada com I_2 0,02N, utilizando-se amido como indicador. O (I_2) é reduzido para (I^-), enquanto o SO_3^{2-} é oxidado para SO_4^{2-} .

eq. 8.14



SULFITO (ÁCIDO SULFUROSO LIVRE)

- Transferir 50 ml da amostra para erlenmeyer de 250 ml.
- Adicionar 0,5 g de Na_2CO_3 (CO_2 liberado remove o O_2 , evitando a oxidação), agitar e adicionar 5 ml de H_2SO_4 (1+3).
- Titular imediatamente para evitar a possibilidade de se titular o SO_2 ligado com a solução de iodo 0,02 N, na presença do indicador (solução de amido 1% - 1 ml); o ponto final da titulação persiste durante 30 segundos.

SULFITO (TOTAL)

- Transferir 25 ml da solução 1 N de NaOH (libera o SO_2 ligado) para erlenmeyer de 250 ml.
- Adicionar 50 ml da amostra, agitar e deixar em repouso durante 15 minutos, com agitação ocasional.
- Adicionar 10 ml de ácido sulfúrico (1+3) e 1 ml da solução de amido e titular com a solução de iodo 0,02N.

SULFITO (PRODUTOS SÓLIDOS)

- 30 g da amostra + 10 ml da solução 0,5 M tampão de tartarato, pH = 4,5 + 490,0 ml H_2O ; bater em liquidificador durante 10 minutos e filtrar.

- Transferir 50 ml do filtrado para erlenmeyer de 125 ml (duas alíquotas).
- Adicionar 4 ml 1 N NaOH e, após 30 segundos, acidificar com 2 ml de HCl 6 N (converte o $\text{SO}_3^{''}$ $\rightarrow$ HSO_3')
- Titular um frasco imediatamente com solução de iodo 0,02 N na presença do indicador (amido 1 ml sol. 1%).
- Em outro frasco, adicionar 1 ml de formaldeído (HCHO 40%), deixar em repouso durante 10 minutos e titular com iodo.

Obs.: Os resultados da titulação das duplicatas devem ser muito próximos (diferença de no máximo 0,3 ml).

EXERCÍCIOS

1) Explicar a função dos seguintes componentes utilizados na determinação de sulfito ou sais de bissulfito em alimentos pelo método da titulação direta:

- * Solução de tartarato.
- * 0,1 N NaOH, 6 N HCl e I_2 0,02 N.
- * 40,0% formaldeído.

2) Descrever o preparo de 1,0 L da solução-tampão de tartarato de sódio 0,5 M e pH 4,5.

Dados: ácido tartárico, $\text{PM} = 150$ ($\text{pK}_1 = 2,93$ e $\text{pK}_2 = 4,23$) e NaOH $\text{PM} = 40$.

3) Explicar por que é necessário realizar o teste em branco quando se determina sulfito ou bissulfito em alimento pelo método da titulação direta.

4) A seguinte análise foi realizada em produto congelado, utilizando a metodologia descrita para produtos sólidos:

Amostra = 30,1 g, contendo 75% de umidade.

Solução de iodo - 0,0194 N.

Calcular a quantidade de sulfito em % e ppm, conforme os dados a seguir:

Amostra	ml de I ₂	Branco	ml de I ₂	% de SO ₂	ppm SO ₂
1	0,50	1	0,30	?	?
	0,40		0,34		
	0,40		0,32		

5) Uma amostra de 40 g de maçã congelada foi utilizada na determinação de dióxido de enxofre. A amostra, conjuntamente com 10 ml de tartarato e 490 ml de água destilada, foi homogeneizada em liquidificador. Duas alíquotas de 20 ml foram tratadas com 0,1 N de NaOH e HCl. Uma alíquota foi imediatamente titulada com solução de I₂ 0,05 N, gastando-se 10,56 ml para completar a titulação. A segunda alíquota foi tratada com formaldeído durante 10 minutos e, então, titulada com I₂ 0,05 N, gastando-se 1,56 ml. Calcular a concentração (% e ppm) de bissulfito de potássio (KHSO₃) na maçã congelada (75% umidade).

6) Calcular a quantidade de sulfito em % e ppm, segundo os dados a seguir:

Amostra	ml I ₂ (0,02N)	% de SO ₂	ppm SO ₂
Suco de maçã (50 ml)	14,5	?	?
	14,0		
Vinho (50,0 ml)	18,0	?	?
	17,5		

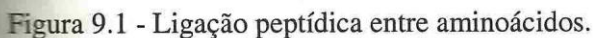
7) Calcular a quantidade necessária de sulfito a ser adicionada a 1 t de suco de uva para se obter a concentração final de 100 ppm, tendo à disposição os seguintes sais:

- Metabissulfito de potássio (K ₂ S ₂ O ₅)	: PM = 222.
- Bissulfito de potássio (KHSO ₃)	: PM = 120.
- Metabissulfito de sódio (Na ₂ S ₂ O ₅)	: PM = 190.
- Sulfito de sódio (Na ₂ SO ₃)	: PM = 126.
- Bissulfito de sódio (NaHSO ₃)	: PM = 104.

Dos sais citados, qual o mais eficiente?

Introdução

As unidades básicas de uma proteína são os aminoácidos. O grupo carboxílico (COOH) de um aminoácido é conectado, pela perda de uma molécula de água, ao grupo amino (NH₂) do próximo, resultando na formação da ligação peptídica (Figura 9.1):



A porção dos aminoácidos que se encontram incorporados à cadeia polipeptídica é denominada resíduo, os quais diferem entre si em função da natureza de sua cadeia lateral (R, R', R'', figura acima).

A informação de como sintetizar determinada proteína está armazenada no núcleo da célula em códigos de sequência de bases orgânicas (adenina, timina, guanina e citosina) presentes na molécula do DNA ou RNA em organismos “simples”. Três bases sucessivas do DNA codificam um dos vinte aminoácidos, e este DNA é mantido como arquivo de referência; sempre que determinada proteína está para ser sintetizada, uma cópia desta informação é passada para o RNA, que se desloca do núcleo e se associa ao ribossoma; e a sequência de bases tripletes originalmente do DNA é traduzida em uma sequência de aminoácidos (Figura 9.2).

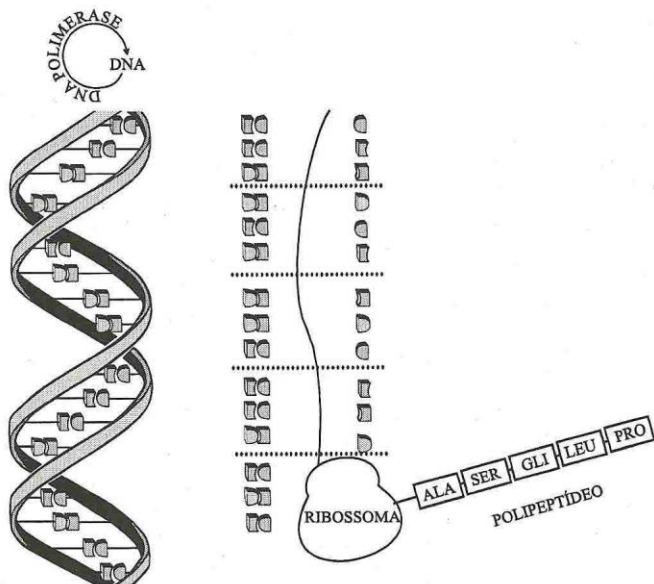


Figura 9.2 - A informação para a síntese da proteína é transcrita do DNA para o RNA e traduzida em sequência de aminoácidos no ribossoma.

A questão importante aqui é ressaltar que a informação original armazenada no DNA é linear, conseqüentemente a proteína é sintetizada como um polímero linear, e a subsequente conformação é determinada exclusivamente pelos tipos e pela distribuição da cadeia lateral presente. Portanto, as propriedades físicas e a estrutura macromolecular das proteínas ocorrem em função da composição de seus aminoácidos.

Os resíduos de aminoácidos localizados na superfície da proteína são os responsáveis pelo comportamento *ácido básico* e pela *solubilidade*, variando com o *pH* e a *temperatura*, *força iônica* e *constante dielétrica*. Portanto, cada AA possui uma cadeia lateral característica (R), que influencia as propriedades físico-químicas e, como resultado, as propriedades da proteína à qual pertence (Tabela 9.1).

Tabela 9.1 - Propriedades dos resíduos dos aminoácidos e solubilidade em água

	Massa (Dáltons)	Volume (Å ³)*	Área acessível na superfície (Å ²)	Ocorrência (%) em proteína**	pK Cad. lat.	Solub. (g.L ⁻¹)
ALA	71,08	88,6	115	9,0		167,2
ARG	156,20	173,4	225	4,7	12	855,6
ASN	114,11	117,7	160	4,4		28,5
ASP	115,09	111,1	150	5,5	4,5	5,0
CIS	103,14	108,5	135	2,8	9,1- 9,5	-
GLU	129,12	138,4	190	6,2	4,6	8,5
GLN	128,14	143,9	180	3,9		7,2
GLI	57,6	60,1	75	7,5		250,0
HIS	137,15	153,2	195	2,1	6,2	
ILE ¹	113,17	166,7	175	4,6		34,5
LEU ¹	113,17	166,7	170	7,5		21,7
LIS ¹	128,18	168,6	200	7,0	10,4	739,0
MET ¹	131,21	162,9	185	1,7		56,2
FEN ¹	147,18	188,9	210	3,5		27,6
PRO	97,12	122,7	145	4,6		1620,0
SER	87,08	89,0	115	7,1		422,0
TRE ¹	101,11	116,1	140	6,0		13,2
TRI ¹	186,21	227,8	255	1,1		13,6
TIR	163,18	193,6	230	3,5	9,7	0,4
VAL ¹	99,14	140,0	155	6,9		58,1

* (Å) = ANGSTRON (0,1 nm).

** (%) Em 207 proteínas de estrutura primária conhecida.

¹ = Aminoácidos essenciais.

Em face da ocorrência de grande variedade de cadeia lateral, quando os aminoácidos estão interligados (Figura 9.3), as proteínas apresentam propriedades químicas e estruturas secundária e terciária

diferentes. A estrutura primária está relacionada com as ligações peptídicas entre os aminoácidos e com a seqüência destes na molécula.

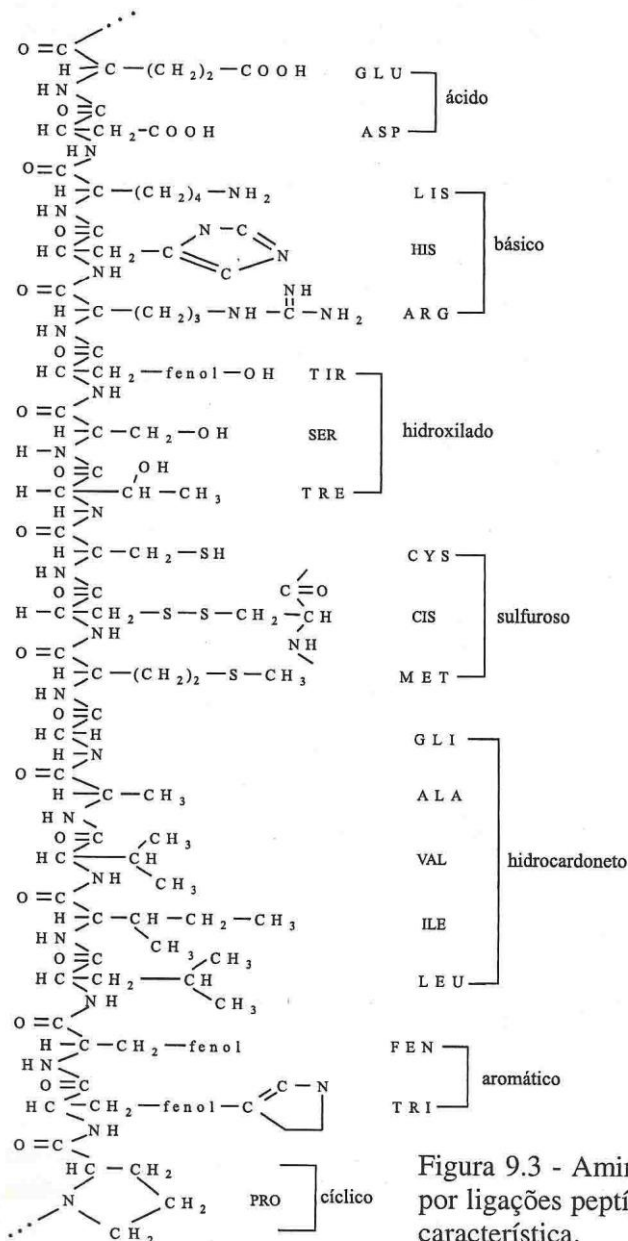


Figura 9.3 - Aminoácidos interligados por ligações peptídicas e cadeia lateral característica.

A composição dos aminoácidos na proteína influencia as propriedades funcionais do alimento e seu comportamento durante o processamento. Por exemplo, as proteínas da carne são desnaturadas em temperatura de 57-75 °C, o que afeta sua capacidade de retenção da água e sua textura. Caseína e gelatina, por outro lado, podem ser aquecidas em temperatura de 100 °C, sem aparente mudança em sua estabilidade. O aspecto da estabilidade pelo calor está relacionado com a composição e a sequência de aminoácido na proteína.

Classificação dos Aminoácidos

Em função da polaridade da cadeia lateral, é possível agrupar os aminoácidos em duas classes:

Aminoácidos não-polares ou de cadeias laterais hidrofóbicas: Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Tri, Val

A hidrofobicidade aumenta com o comprimento da cadeia lateral alifática, com tendência de se localizar na parte interna da proteína, minimizando o contato com a água. Os aminoácidos glicina e alanina são moléculas tão pequenas, que podem se acomodar tanto na parte externa como na interna de uma proteína.

Por causa da interação entre os vários tipos de cadeia lateral na proteína e do relativo grau de interação diferenciada com a molécula de água, a proteína raramente se encontra estendida (linear) e sim dobrada, formando uma estrutura tridimensional.

Os aminoácidos polares interagem com a água, maximizando o contato e conseqüentemente tendem a se localizar na superfície da molécula da proteína. Quando no interior, interagem entre si, formando pontes de hidrogênio, portanto, são localizados muito próximos.

Os aminoácidos não-polares tendem a se localizar internamente na proteína, minimizando o contato com a água, e o grupo sulfidríla (SH) do aminoácido cisteína interage entre si, formando pontes de enxofre.

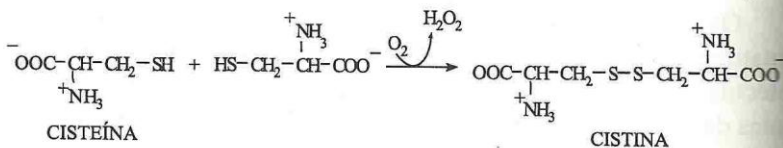
Todos aqueles aminoácidos que possuem cargas na cadeia lateral são geralmente localizados na superfície da proteína, podendo ser encontrados também no seu interior, se os seus grupos polares estiverem neutralizados pela formação de pontes de hidrogênio. Tirosina e triptofano localizam-se tanto no interior quanto no exterior da proteína, mas, quando no interior da molécula, a hidroxila da tirosina é utilizada para formar pontes de hidrogênio.

Os grupos polares com carga podem ser neutralizados, dependendo do pH do meio. Em condições ácidas, o aspártico e o glutâmico possuem grupos carboxílicos não-carregados, enquanto a histidina, lisina e arginina estarão protonadas, possuindo cargas positivas. Em condições básicas, os grupos carboxílicos do aspártico e glutâmico estarão ionizados e a arginina, lisina e histidina estarão sem cargas.

Aminoácidos polares

São os de cadeia lateral hidrofílica e localizados na superfície da proteína, sem carga, apresentando grupos funcionais neutro e polar capazes de estabelecer pontes de hidrogênio com moléculas apropriadas como a água. A polaridade da *Ser*, *Tre* e *Tir* está relacionada aos grupos hidroxila; a polaridade da *asparagina* e *glutamina*, ao grupo amida ($-\text{CO}-\text{NH}_2$); e a da *Cis*, ao seu grupo tiol ($-\text{SH}$) (Apêndice 3). Em proteínas, a cisteína está frequentemente presente no estado oxidado, isto é, como cistina (eq. 9.1). Isto ocorre quando o grupo tiol de duas moléculas de cisteína, localizada na parte interna da proteína, se oxida, formando pontes de enxofre.

eq. 9.1



Aminoácidos polares básicos

São os de cadeia lateral positivamente carregada (pH próximo à neutralidade): *Lis*, *Arg* e *His*. O grupo NH_2 é responsável pela carga da lisina, e o grupo guanidino, pela carga da arginina.

Aminoácidos polares ácidos

São os de cadeia lateral negativamente carregado (pH próximo de 7,0): *ácidos glutâmico e aspártico*.

Alterações da Proteína no Processamento de Alimento

Diversas reações degradativas durante o processamento e armazenamento podem ocorrer, acarretando alterações indesejáveis na proteína. Como resultado, as proteínas podem apresentar perdas de funcionalidade e qualidade nutricional, bem como alterações desejáveis ou indesejáveis do *flavor* e aumento do risco de toxidez.

As alterações importantes que afetam as proteínas incluem aquecimento na presença e ausência de carboidratos, pH extremos (particularmente alcalino) e exposição a condições oxidativas, incluindo lipídios oxidados e luz (Figura 9.4).

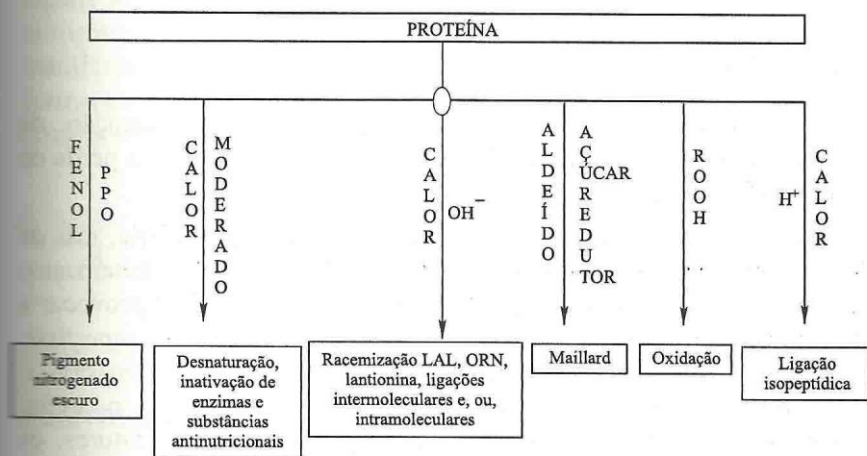


Figura 9.4 - Alterações de cor, *flavor*, textura e valor nutritivo.

Nutrientes são destruídos quando os alimentos são processados, em razão da sensibilidade ao pH do solvente, oxigênio, luz e aquecimento ou

da combinação destes. A maioria dos procedimentos comerciais, como desidratação e enlatamento, resulta em efeitos não-significativos na qualidade da proteína. Existem, entretanto, exceções, como condições em que o alimento é exposto a pH elevado, aquecimento severo ou a lipídios oxidados.

As condições de processamento a que a proteína é exposta podem resultar em diversas alterações na cadeia lateral dos aminoácidos. Em condições alcalinas, por exemplo, ocorrem a racemização de aminoácidos e ligações cruzadas, resultando em diminuição da qualidade nutricional e mudanças significativas de sua funcionalidade. Os aminoácidos arginina, treonina, cistina, serina e cisteína são lentamente destruídos, enquanto glutamina e asparagina são deaminadas em condições alcalinas.

Em meio ácido, o triptofano é rapidamente destruído, ainda mais se aquecido em temperatura elevada. A luz ultravioleta destrói o triptofano, a tirosina e a fenilalanina. Aminoácidos sulfurosos são destruídos na presença de produtos oriundos da oxidação de lipídios. Todos os aminoácidos, especialmente a lisina, treonina e metionina, são sensíveis ao aquecimento seco e a reações de escurecimento.

Desnaturação

A desnaturação de proteínas é definida como alteração da conformação em todas as partes de sua molécula, acarretando a perda de sua atividade biológica e funcionalidade.

Desnaturação não envolve alterações da estrutura primária, mas de todas as outras (secundária, terciária e quaternária). Diversos tratamentos são utilizados no processamento de alimento e vários podem provocar a desnaturação da proteína. Estes incluem *calor, alteração da superfície, alteração do pH e concentrações salinas, desidratação (mesmo à temperatura baixa), diferentes aditivos etc.* Geralmente, o efeito desnaturante final é provocado pela combinação de vários fatores, os quais rompem a conformação original da proteína.

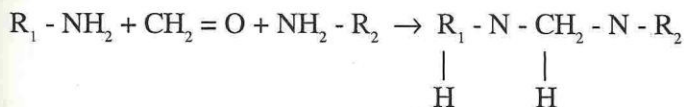
A desnaturação altera várias propriedades importantes da proteína, do ponto de vista da tecnologia de alimentos. A proteína desnaturada é geralmente menos solúvel ou até mesmo insolúvel, aumenta a viscosidade do alimento e a reatividade de grupos laterais.

A proteína desnaturada é mais sensível à hidrólise pelas enzimas proteolíticas, e, portanto, em muitos casos a sua digestibilidade e utilização aumentam. O branqueamento e a pasteurização utilizados durante diferentes tratamentos tecnológicos provocam a desnaturação da proteína, acarretando a inativação enzimática e a eliminação dos efeitos tóxicos de várias proteínas (toxinas microbianas e inibidores enzimáticos naturais etc.).

A estabilidade da proteína aumenta com a solvatação. Sabe-se que nas proteínas globulares os aminoácidos hidrofóbicos se localizam na parte interna dos glóbulos, enquanto os grupos polares (hidrofílicos) estão situados na parte externa e expostos ao solvente (água). Em face desta organização, camadas de água são ligadas à superfície da proteína (0,2 - 0,5 g de água/g de proteína). No caso da gelatina (colágeno desnaturado), a quantidade de água ligada chega até 99 vezes o seu peso. De modo geral, a hidratação aumenta a estabilidade à desnaturação e à subsequente precipitação.

A reação de proteínas com os constituintes da fumaça provoca também sua desnaturação, escurecimento do produto e diminuição de alguns aminoácidos. Durante o processo convencional de defumação de alimentos, as reações dos constituintes da fumaça com as proteínas se manifestam principalmente na camada superficial. A principal reação é a formação de pontes metilênicas durante a reação com o formaldeído (constituente da fumaça) com grupos amina das proteínas (eq. 9.2).

eq. 9.2



Alteração da solubilidade

A solubilidade das proteínas é determinada por três fatores principais: grau de hidratação, densidade e distribuição de cargas ao longo da cadeia e presença de substâncias não-protéicas como fosfatos, carboidratos e lipídios, que podem apresentar efeito estabilizante. A insolubilidade completa das proteínas produz um precipitado, mas isto ocorre somente quando várias moléculas do polipeptídeo se aproximam

de tal forma, que produzem agregados de proteína suficientemente grandes para serem visíveis e centrifugados com baixa força (g). Isto pode ser conseguido, ajustando-se o pH no ponto isoelétrico (pI) da proteína, pela adição de sal ou pelo uso de certos solventes ou pela combinação destes com a temperatura. Portanto, as propriedades solventes da água podem ser manipuladas para alterar a solubilidade da proteína.

A distribuição de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos na superfície da proteína determina a solubilidade em diferentes solventes. Embora grupos hidrofóbicos tendam a estar concentrados no interior das moléculas da proteína, um número substancial está localizado na superfície e em contato com o solvente (Figura 9.5).

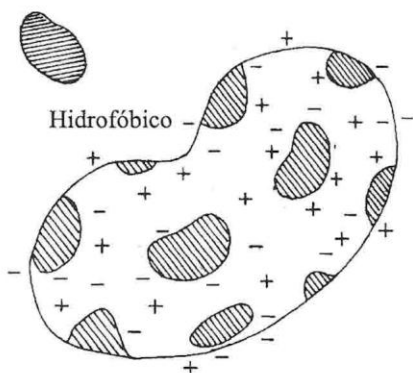


Figura 9.5 - Distribuição de cargas e grupos hidrofóbicos na superfície da proteína.

O efeito do pH na dissociação de grupos funcionais da proteína altera as cargas e, portanto, a magnitude das forças atrativas e repulsivas. A dependência do pH é ilustrada na Figura 9.6. O ponto mínimo da curva representa o ponto-isoelétrico (predominam as forças de atração). Com o aumento da dissociação dos grupos funcionais da proteína em ambos os lados do pI, ocorre a predominância das cargas repulsivas adjacentes e a capacidade de retenção da água aumenta. Neste caso, os valores máximos correspondem aos de pH 2,2 e 11, com os grupos funcionais completamente dissociados.

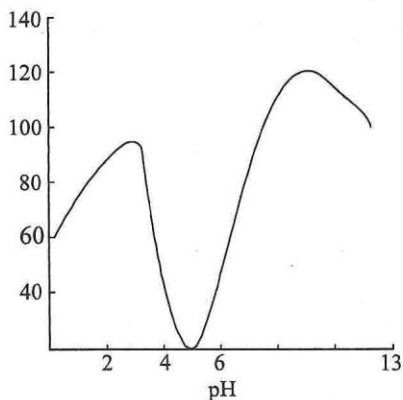


Figura 9.6 - Influência do pH na capacidade de retenção de água (CRA) em carne.

Na fabricação de queijo, a precipitação da caseína é obtida pela adição da renina ao leite (Figura 9.7). A renina hidrolisa a ligação peptídica entre os aminoácidos *Fen*₁₀₅-*Met*₁₀₆ da *k*-caseína, resultando em dois macropeptídios: ácido e básico. A liberação do macropeptídeo hidrofílico (ácido) reduz as cargas da superfície e, conseqüentemente, aumenta as interações hidrofóbicas responsáveis pela coagulação.

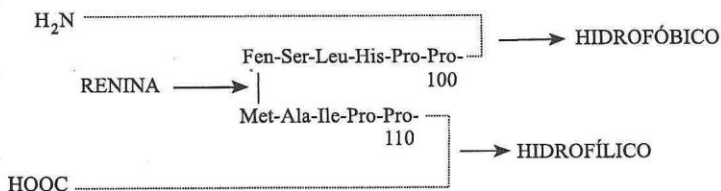


Figura 9.7 - Ação da renina sobre a caseína.

Na indústria de bebidas, a interação de compostos fenólicos com proteínas (Figura 9.8) afeta a solubilidade, ocasionando sua precipitação. Substâncias fenólicas são componentes naturais de vegetais e possuem tendência de interagir com proteínas (pontes de hidrogênio). A formação do complexo insolúvel (proteína-tanino) e a conseqüente precipitação durante o resfriamento em cerveja podem ser evitadas pela adição de papaína, a qual hidrolisa parcialmente a proteína oriunda do grão e da levedura, prevenindo a interação com o tanino durante o resfriamento.

Mudança da Força Iônica

A força iônica mede a concentração de cargas em solução. A relação entre a força iônica e a molaridade da solução do sal ionizado depende do número de íons produzidos e de sua carga líquida, podendo ser resumida conforme a seguir:

$$\text{FORÇA IÔNICA} = 1/2 \sum C_i (Z_i^2)$$

$\sum$ = somatório C = conc. de íons em solução Z = valência do íon em solução

Sal

Tipo	Exemplo	Força iônica
1:1	KCl, NaBr	1 M
2:1	CaCl ₂ , Na ₂ HPO ₄	3 M
2:2	MgSO ₄	4 M
3:1	FeCl ₃ , Na ₃ PO ₄	6 M
2:3	Fe ₂ (SO ₄) ₃	15 M

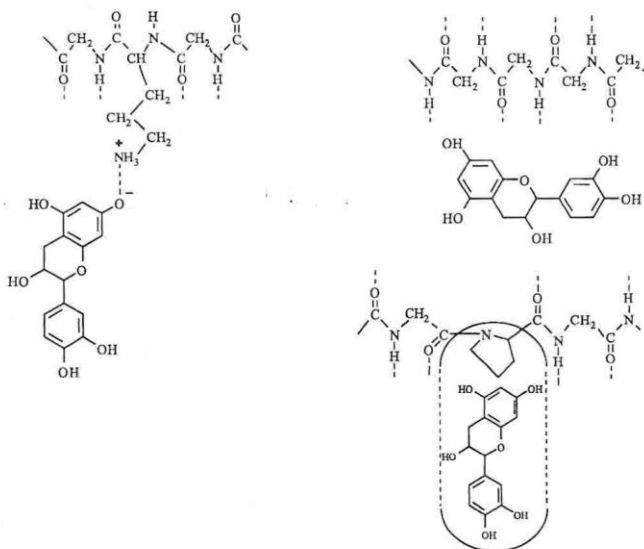


Figura 9.8 - Interação da proteína com tanino.

A natureza do sal é muito importante. Os sais considerados ótimos são aqueles capazes de promover a hidratação da região polar e a desidratação das regiões hidrofóbicas da proteína. Somente carga líquida do íon é utilizada no cálculo da força iônica. Assim, compostos não-ionizados ou espécie contendo um número igual de cargas (+) e (-) não contribuem para a força iônica da solução.

Os sais mais efetivos são aqueles ânions de cargas múltiplas, como *sulfatos*, *fosfatos* e *citratos*. O cátion é menos importante, mas deve ser monovalente (NH_4^+ , K^+ , Na^+ em eficiência de precipitação). Por exemplo, algumas proteínas são prontamente *salted-out*, isto é, têm sua solubilidade diminuída (precipita) com o aumento da concentração de sal (Figura 9.9). Isto ocorre em virtude da competição entre a proteína e os íons salinos pela molécula de água, o que, conseqüentemente, leva à remoção da água de hidratação da proteína, ocasionando maior interação *proteína-proteína*, que se torna mais forte que a interação *proteína-água*, e assim ocorre a agregação das moléculas de proteína, seguida da precipitação.

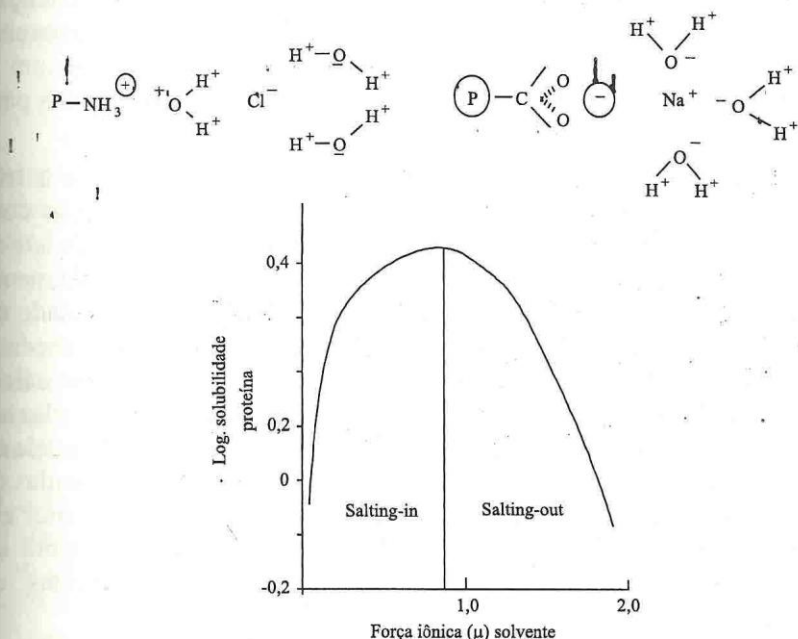


Figura 9.9 - Solubilidade da proteína em função da concentração salina.

Em contraste, para a grande maioria das proteínas, baixa concentração de sal aumenta a solubilidade (para determinados pH e temperatura). Tal fato é denominado *salting-in*, resultante do efeito do sal sobre as interações eletrostáticas, estabilizando os grupos com cargas na superfície das proteínas. Com o aumento da concentração salina, eventualmente todos os grupos carregados estarão protegidos e a proteína torna-se efetivamente uma molécula neutra-dipolo (neutralização de cargas).

O efeito da adição de sais afeta a hidratação de proteínas e sua capacidade de retenção. No processamento de carnes, a adição de fosfato promove a interação com íons de cálcio, interferindo nas ligações cruzadas entre os filamentos. Esse efeito resulta no aumento da capacidade de retenção de água. O cloreto de sódio afeta a retenção na carne pela interação dos íons de Na^+ com os grupos funcionais da proteína em substituição ao Ca^{++} (ligações cruzadas são eliminadas) e pela interação com as cargas na cadeia peptídica.

Os polifosfatos são muito utilizados no processamento de carnes, aves e peixes, para o controle da perda de fluidos (capacidade de retenção de água), obtendo-se um produto de textura mais succulenta. As misturas de polifosfatos são as mais utilizadas (tripolifosfato de sódio com o hexametáfosfato de sódio). Os fosfatos adicionados são hidrolisados para pirofosfatos, que são os agentes ativos.

O efeito dos polifosfatos na hidratação da carne deve-se a três fatores: aumento do pH, aumento da força iônica e complexação com íons metálicos. Quanto maior a diferença do pH do ponto isoelétrico da carne ($\text{pH} \sim 5,4$), maior será a repulsão eletrostática devido ao aumento das cargas negativas líquidas da proteína. O aumento da capacidade de retenção de água está também relacionado com a propriedade sequestrante dos ânions fosfatos. Os polifosfatos complexam com cálcio e magnésio ligados à proteína do músculo, liberando as moléculas de proteína das ligações cruzadas ocasionadas por esses cátions. A cadeia de polipeptídeo então separada anula o efeito repulsivo, e mais moléculas de água podem então ser imobilizadas pela proteína. Esse efeito é maior em pH acima do PI ou pela adição de sal, que ocasiona o aumento da repulsão eletrostática e adicional afrouxamento das moléculas de proteínas.

Mudanças no pH

As proteínas são, em sua maioria, sensíveis ao pH da solução em que se encontram dissolvidas, em razão das características ácida e, ou, básica da cadeia lateral dos aminoácidos (Figura 9.3). Alterando-se o pH da solução, o grau de ionização dos grupos laterais é também alterado. Para que a proteína permaneça em solução, é necessária a presença de carga. As proteínas são polímeros de alto PM, constituídos de alfa-aminoácidos contendo vários grupos amina e carboxílico, os quais, dependendo do meio em que se encontram, se comportam como ácido ou base. Para explicar como estas reações (ácido-base) afetam a solubilidade das proteínas, algumas simplificações serão consideradas:

- a proteína com somente um grupo ácido e um básico: grupo carboxílico (ác. aspártico) e amina (lisina).
- o grupo amina na sua forma protonada ($-\text{NH}_3^+$), comportando-se, como ácido; ambas as cadeias laterais podem ser tratadas como ácido. O grupo carboxílico é um ácido e ioniza-se em solução, como indicado pela seguinte equação:



O pK indicado corresponde aos valores de pK dos ácidos glutâmico e aspártico. O grupo amina é uma base, a qual reage com os íons de hidrogênio em solução, formando o íon amônio. Este íon se comporta como um ácido, como indicado pela seguinte equação:



O pK indicado corresponde às formas protonadas dos três aminoácidos básicos: lisina, arginina e histidina. Estes valores de pKa para o ácido carboxílico e da amina protonada indicam que o ácido carboxílico é um ácido forte.

- a proteína se encontra em solução em $\text{pH} = 11$. Como o pH é muito maior que o pKa de ambos (do ác. carboxílico e da amina protonada), o equilíbrio de ambas as reações acima será deslocado para a direita. Portanto, a amina se encontra na forma neutra (R-NH_2) e o ácido carboxílico na sua forma iônica (R-COO^-). A proteína pode ser representada nesta condição como $\text{H}_2\text{N} - \text{proteína} - \text{COO}^-$. A carga

líquida é -1, as moléculas se repelem entre si e a proteína permanece em solução.

- o pH da solução é abaixado para 6,0 pela adição de ácido. Nesta situação, o pH se encontra abaixo do pKa da amina protonada, mas acima do pKa do ácido carboxílico. A posição de equilíbrio para a ionização do ácido carboxílico será para a direita e, para a amina, para a esquerda. O ácido carboxílico está na sua forma iônica ($-\text{COO}^-$), a amina se encontra também na forma ionizada ($-\text{NH}_3^+$) e a proteína pode ser assim representada: $^+\text{H}_3\text{N} - \text{proteína} - \text{COO}^-$.

A carga líquida é zero (ponto isoelétrico), e as moléculas não se repelem; atraem-se, formando agregados e precipitando.

- mais ácido é adicionado à solução e o pH final seja 2,0. Nesta condição, o pH da solução é menor que o de ambos os pKa e a posição de equilíbrio de ambas as reações de ionização será para a esquerda. A molécula de proteína pode ser assim representada:



A carga líquida é positiva, as moléculas se repelem e o precipitado de proteína formado no ponto isoelétrico se redissolve. As proteínas que possuem o ponto isoelétrico em pH abaixo de 7,0 são consideradas ácidas, e todas aquelas acima de 7,0 são consideradas básicas.

As proteínas estão, em sua maioria, presentes no fluido celular na forma solúvel. A solubilidade é o resultado da interação polar com o solvente aquoso e das interações iônicas com os sais presentes e, de certa forma, com as forças eletrostáticas repulsivas entre cargas iguais das moléculas. Em força iônica variando de zero à condição fisiológica, algumas proteínas se precipitam, em razão de as forças repulsivas serem insuficientes. Por exemplo, alta superfície de hidrofobicidade significa pequena interação com solvente e poucos grupos carregados para interagirem com sais.

A mudança do pH, portanto, altera a distribuição de sítios polares catiônicos, aniônicos e não-iônicos na molécula da proteína, os quais afetam as interações *água-proteína* e *proteína-proteína*. No ponto isoelétrico, a molécula de proteína possui carga líquida igual a zero (Figura 9.10), apresentando máxima interação eletrostática entre grupos

carregados e interação mínima com a água e, assim, ocorrendo agregação e precipitação.

No PI, os grupos carregados não estão disponíveis para interagir com as moléculas de água. Portanto, a quantidade de água ligada é mínima. A molécula de proteína exibe, nesta situação, pequena hidratação, pouco inchamento e baixa solubilidade. Para valores de pH elevados ou menores que o PI, a proteína apresenta cargas elétricas positivas e negativas, respectivamente, e as moléculas de água podem interagir com estas cargas, contribuindo para a sua solubilização.

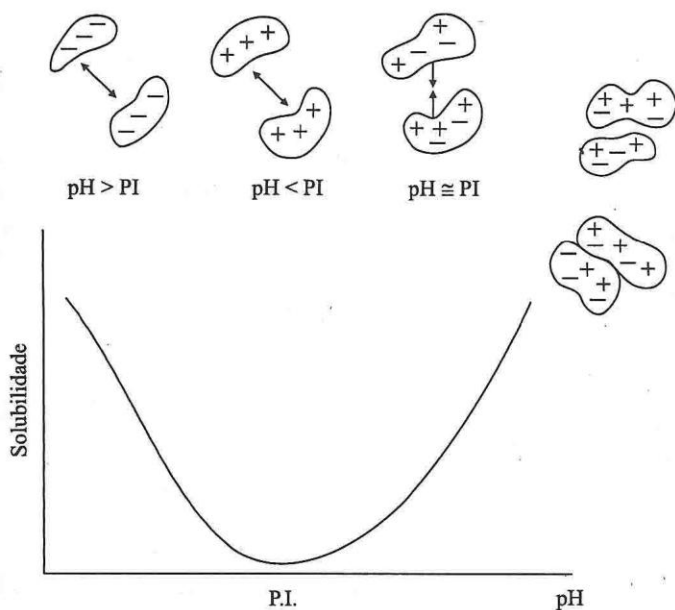
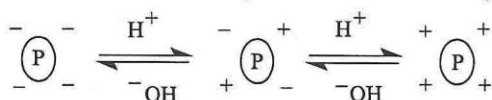


Figura 9.10 - Solubilidade da proteína em função do pH.

Em pH extremos, ocorre a desnaturação, pelo fato de que as áreas sensíveis da proteína adquirem mais cargas iguais, provocando repulsão

interna, ou talvez pela perda de cargas, as quais são previamente envolvidas nas forças de atração da proteína (Figura 9.11).

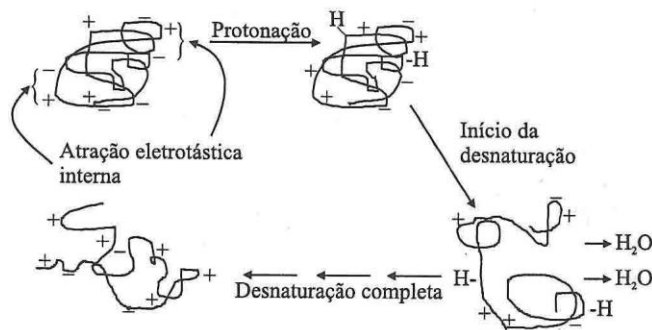


Figura 9.11 - Desnaturação da proteína em pH extremo.

Se a solubilidade é plotada em função do pH, a forma de U (Figura 9.10) é obtida e a solubilidade mínima ocorre no PI. Tal procedimento é utilizado para dissolver grande número de proteínas presentes em sementes. A solubilidade e, portanto, o rendimento de extração são maiores em pH alcalino que em pH ácido. De fato, grande número de resíduos de aminoácidos estão carregados negativamente em $\text{pH} > \text{PI}$ (Asp, Glu) e em quantidades maiores que as dos grupos carregados positivamente no $\text{pH} < \text{PI}$.

A solubilidade da proteína e sua extração em pH alcalino podem ser aumentadas pela elevação da carga líquida negativa da proteína (Figura 9.10). A solubilidade é, portanto, influenciada pelas cargas elétricas da molécula.

Tratamento alcalino

O tratamento alcalino é prática comum na indústria de alimentos, sendo utilizado para diversos propósitos. A exposição da proteína a condições alcalinas pode ocorrer durante o armazenamento e o processamento do alimento: remoção da casca de frutas e vegetais, solubilização e texturização de proteínas, produção de caseinato, gelatina e invólucro para salsicha, remoção da carne residual do osso e destruição de enzimas e toxinas.

Somente L-aminoácidos estão inicialmente presentes na maioria das proteínas. Os alimentos são geralmente aquecidos (esterilização, pasteurização etc.) e, em algumas situações, submetidos ao tratamento alcalino. Durante esses tratamentos, a racemização (D-aminoácido) e outras reações, como ligações cruzadas entre resíduos de aminoácidos, ocorrem.

A exposição de proteínas a determinadas condições de processamento induz a formação de duas principais alterações químicas: a racemização de todos L-aminoácidos para D-isômeros e a formação de ligações cruzadas como a lisinoalanina. A racemização que ocorre em alimentos e outras proteínas é dependente do pH, da temperatura e do tempo de exposição. A dieta humana contém D-aminoácidos proveniente do processamento do alimento e, ou, naturalmente formado (microorganismos, vegetais).

São encontrados em alimentos e estão sujeitos à racemização para D-isômeros sob a influência das condições de processamento, especialmente calor e pH alcalino. Embora as proteínas contendo D-aminoácido possam ser hidrolisadas, a velocidade é mais lenta. Como resultado do processamento de alimentos que utilizam tratamento alcalino e temperatura, D-aminoácidos são continuamente formados e consumidos (Tabela 9.2).

O tratamento alcalino mesmo em temperatura moderada provoca significativa racemização (D-aminoácido) em todos os aminoácidos. A serina e o ácido aspártico são mais propensos à racemização em condições alcalinas que os demais. Em pH abaixo de 10, insignificante racemização ocorre, exceto para serina e ácido aspártico.

Tabela 9.2 - Alimentos contendo D-aminoácido

-
- 1 - Cerveja, vinho (branco/tinto), vinagre
 - 2 - Culturas bacterianas, extrato de leveduras
 - 3 - Pães e derivados
 - 4 - Derivados da soja (farinha, proteína e fermentados)
 - 5 - Cacau, café
 - 6 - Leite e derivados (fermentado, caseinatos, queijos)
 - 7 - Carne e derivados (bacon, salsicha)
 - 8 - Ovo
 - 9 - Frutas e vegetais
-

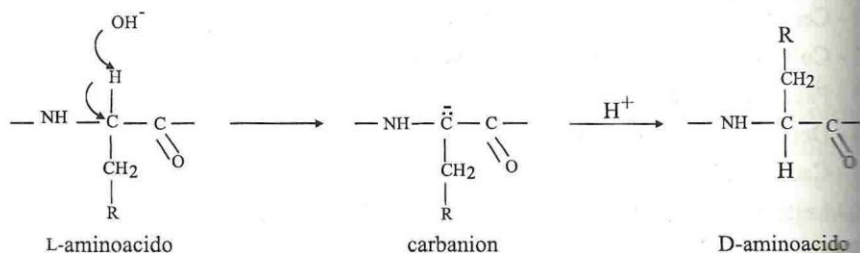
A preparação de isolados protéicos de fontes biológicas envolve diversas operações unitárias, como precipitação isoeletrica, precipitação salina, coagulação térmica e ultrafiltração. Certas proteínas presentes no extrato bruto são perdidas durante essas operações. Por exemplo, durante a precipitação isoeletrica algumas proteínas tipo albuminas sulfurosas, as quais são solúveis no pH isoeletrico, podem ser perdidas no sobrenadante. Tais perdas podem alterar a composição de aminoácidos e o valor nutricional da proteína isolada, comparada ao extrato bruto.

Racemização

O processamento térmico da proteína em pH alcalino converte parcialmente L-aminoácido em D-aminoácido. A hidrólise ácida da proteína também promove certa racemização, assim como aquecimento da proteína ou do alimento em temperatura acima de 200°C. O mecanismo em pH alcalino envolve a remoção do próton do átomo de carbono na posição α pelo íon hidroxila (eq. 9.3) e subsequente adição do próton da solução. A velocidade de racemização é dependente da concentração do íon hidroxila.

A racemização do aminoácido reduz a digestibilidade da proteína, em razão de a ligação peptídica, que envolve o D-aminoácido, ser menos eficientemente hidrolisada pelas proteases, menos absorvida pela mucosa intestinal e não ser utilizada na síntese de uma nova proteína. Em aves, a D-prolina é neurotóxica.

eq. 9.3



Ligações cruzadas

Diversas proteínas possuem tanto ligações intra como intermoleculares, como as pontes de enxofre em proteínas globulares. A função dessas ligações na proteína nativa é minimizar a proteólise. O processamento do alimento, especialmente em pH alcalino, leva à formação de novas ligações cruzadas. Tais ligações covalentes artificiais entre as cadeias de polipeptídios reduzem a digestibilidade e disponibilidade biológica dos aminoácidos essenciais envolvidos ou próximos à ligação.

O aquecimento da proteína em pH alcalino ou aquecimento em temperatura elevada ($>200^{\circ}\text{C}$), em pH neutro, resulta na remoção do próton do átomo de carbono na posição α , levando à formação do carbânio (eq. 9.4). Os carbânios derivados da Cys, cistina e fosfoserina, após a reação de β -eliminação, resultam na formação da deidroalanina (DHA). Uma vez formada, a DHA reage com grupos nucleofílicos, como o ϵ -amino grupo da lisina, grupo tiol da Cys, δ -amino grupo da ornitina (formado pela decomposição da histidina), resultando na formação de lisinoalanina, lantionina, ornitinoalanina e histidilalanina em proteínas. A lisinoalanina (LAL) é a principal ligação cruzada encontrada em proteína tratada com base.

A formação de ligações cruzadas entre proteína-proteína tratada com base diminui sua digestibilidade e seu valor biológico. A diminuição da digestibilidade está relacionada à inabilidade da tripsina de hidrolisar a ligação peptídica cruzada da lisinoalanina e ao impedimento histérico provocado pela ligação cruzada de outras ligações peptídicas localizadas na proximidade. A LAL livre é absorvida pelo intestino, mas não é utilizada pelo organismo, sendo excretada em grande parte pela urina.

A extensão de formação da LAL é dependente da temperatura e do pH. Em pH elevado, há maior formação; em temperatura elevada, como a usada no leite, ocorre significativa formação de LAL mesmo em pH neutro (Tabela 9.3). Nas condições utilizadas em processamento de alimento, a formação de LAL é pequena. Entretanto, a redução da digestibilidade e da disponibilidade da lisina e a racemização de aminoácidos são indesejáveis.

Do ponto de vista nutricional, o tratamento alcalino também promove a destruição progressiva de vários aminoácidos (Cis, Arg, Tre e

Ser) e a formação indesejável de novos aminoácidos, como *lisinoalanina*, *lantionina* e *ornitinoalanina* etc. A lisinoalanina (Tabela 9.3) é formada pela desidratação da cistina ou serina para deidroalanina e pela subsequente reação entre o grupo epsilon-NH₂ da lisina e a ligação insaturada da deidroalanina (eq. 9.4).

eq. 9.4

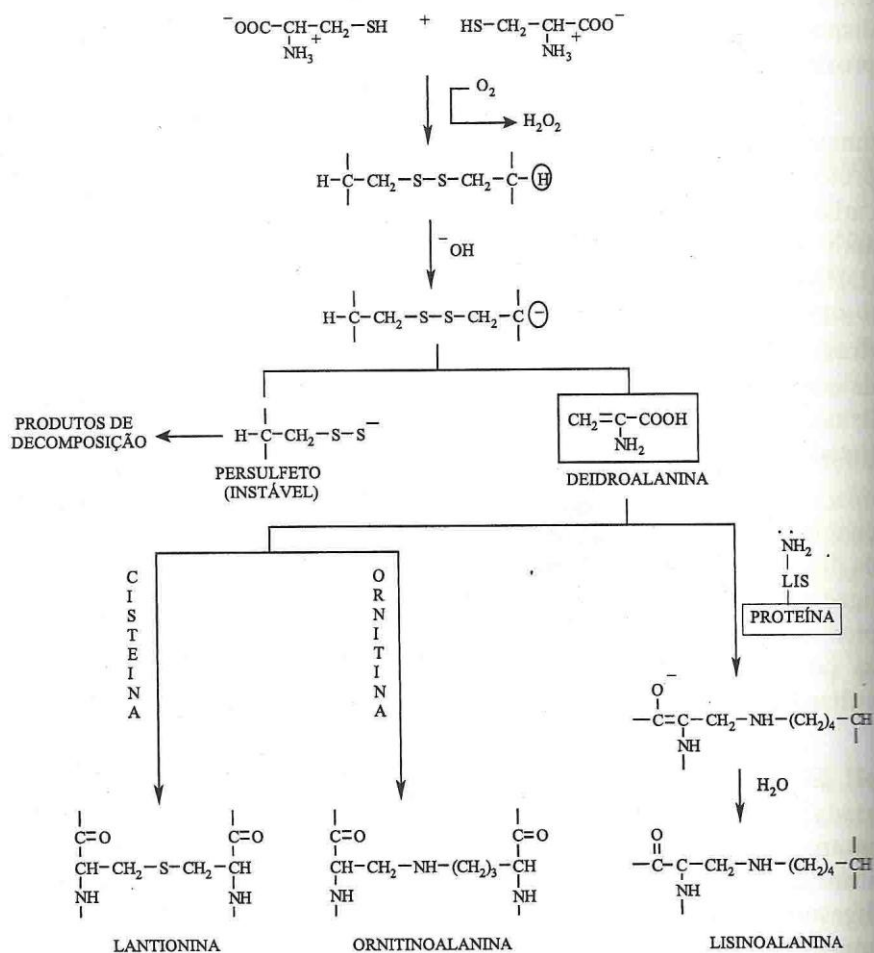


Tabela 9.3 - Lisinoalanina (LAL) em alguns produtos

Produto	Tratamento	LAL(mg/kg de Proteína)
Salsicha (Frankfurt)	Crua	0
	Cozida	50
	Assada	170
Clara de ovo em pó		160-1.820
Clara de ovo líquida		15
Clara de ovo	Fervura/3 min	140
	" /10 min	270
	" /30 min	370
	Assada/10 min/150°C	350
	" /30 min/150°C	1100
Leite condensado açucarado		360-540
Leite condensado		590-860
Caseinato de sódio		430-6.900
Caseinato de potássio		25
Caseinato de cálcio		370-1.000
Isolado de soja		0-370
Proteína vegetal hidrolisada		40-500
Chocolate em pó		130-190
Alimento infantil		50-150
Leite, UHT (145°C/3 seg.)		160-370
Leite, HTST (73°C/15 seg.)		260-1.030

Fatores que influenciam a formação de LAL incluem: *tipo de proteína, concentração e tipo do sal alcalino utilizado, temperatura e tempo de exposição*. De modo geral, a qualidade nutricional da proteína tratada com base diminui graças à destruição de aminoácidos essenciais e à formação de aminoácido na forma D (racemização) e de ligações isopeptídicas (cruzadas) entre os resíduos de aminoácidos, impedindo o acesso de proteases e a conseqüente diminuição da digestibilidade.

O efeito tóxico da LAL ocorre em razão de sua característica de complexação, removendo ou competindo com os metais das metaloenzimas, o que provoca a inibição enzimática. O tratamento alcalino moderado preconizado para a indústria de alimentos, com a utilização do bicarbonato de sódio em substituição ao hidróxido de sódio ou carbonato, parece não produzir níveis relevantes de lisinoalanina. A presença de níveis elevados de LAL é indicativo de tratamento alcalino severo, procedimento que não deve ser recomendado.

Adição de Solventes Orgânicos Miscíveis

Proteínas em solução aquosa podem ser precipitadas pela adição de solventes orgânicos miscíveis em água, como *etanol* ou *acetona*. O efeito principal está na redução da atividade da água, o que pode ser traduzido em termos de redução da constante dielétrica do meio (Tabela 9.4) ou simplesmente pelo deslocamento da água, associada à sua parcial imobilização, mediante a hidratação com solvente orgânico. O etanol, por exemplo, tem uma constante dielétrica pequena se comparada com a da água, e sua adição na solução contendo proteína aumenta a força de atração entre as cargas opostas, diminuindo o grau de ionização dos grupos (R). Como resultado, as proteínas tendem a se agregar e precipitar.

Tabela 9.4 - Constante dielétrica (D) de alguns solventes

Líquido	D*
Água	80
Metanol	33
Etanol	24
Acetona	21,4
Benzeno	2,3
Hexano	1,9

* (D) = Tendência de se opor à atração eletrostática entre íons positivos e negativos.

Álcoois e acetona, quando adicionados à solução protéica, competem com a proteína pela água, diminuindo a constante dielétrica da solução e as forças repulsivas de cargas iguais e provocando agregação das moléculas e sua precipitação.

A precipitação ocorre em baixa concentração do solvente orgânico e próximo do ponto isoelétrico da proteína. Portanto, ocasiona diminuição das interações eletrostáticas que contribuem para a estabilidade da proteína, aumentando a força de atração entre cargas opostas na molécula da proteína e provocando sua agregação e precipitação.

Geralmente, quanto maior a molécula, menor é a porcentagem de solvente orgânico requerida para precipitar a proteína. Moléculas maiores agregam-se mais rapidamente, em razão da maior chance de possuírem superfícies carregadas, que se associam às de outras moléculas de proteínas (Figura 9.12).

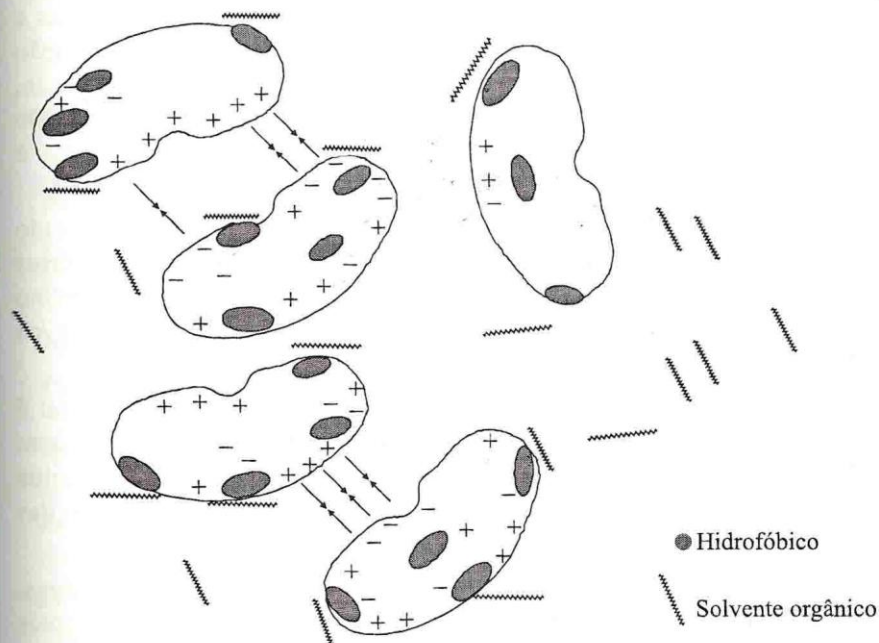


Figura 9.12 - Agregação de proteínas pela interação com solventes orgânicos.

Os solventes orgânicos são capazes de penetrar na região hidrofóbica da proteína, rompendo e expondo estas interações e, assim, provocando sua desnaturação. A ação desnaturante pode ser também resultante da interação do solvente com a água.

Tratamento Térmico

O processamento comercial de alimentos envolve tratamentos físico, químico e biológico; dentre estes, o aquecimento é o mais comum, com diversos objetivos: inativação de microrganismo e de enzimas endógenas que promovem alterações oxidativa e hidrolítica durante o armazenamento e na melhoria da palatabilidade. Infelizmente, os efeitos benéficos obtidos pelo aquecimento podem afetar o valor nutritivo e as propriedades funcionais da proteína.

As proteínas são, em sua maioria, desnaturadas quando expostas a moderado aquecimento (60 – 90 °C, 1h ou menos). A desnaturação excessiva da proteína frequentemente resulta na sua insolubilização, afetando as propriedades funcionais dependentes da solubilidade. Do ponto de vista nutricional, a desnaturação parcial melhora a digestibilidade e a disponibilidade biológica de aminoácidos essenciais.

Além de melhorar a digestibilidade, o tratamento térmico moderado inativa diversas enzimas, como proteases, lipases, lipoxigenases, amilases e polifenoloxidasas. A não-inativação dessas enzimas resulta no aparecimento de sabor e odor indesejáveis, rancidez e alterações na textura e na descoloração do alimento durante a estocagem.

O tratamento térmico moderado das proteínas de origem vegetal é benéfico, em razão da presença de fatores antinutricionais de origem protéica. Legumes e oleaginosas possuem diversos inibidores de tripsina e quimotripsina (Capítulo 6); estes afetam a eficiente digestão das proteínas, reduzindo a sua disponibilidade biológica.

Diferentes proteínas são desnaturadas em diferentes temperaturas. O calor fornece energia para romper as interações não-covalentes (pontes de hidrogênio e ligações iônicas) que estabilizam a estrutura nativa da proteína (Apêndices 3 e 4), expondo e permitindo a interação de grupos hidrofóbicos em seu interior (Figura 9.12).

A coagulação de proteínas pelo calor é dependente de diversos fatores: *pH*, *força iônica*, *teor de umidade* e *tipo de ion em solução*. Algumas proteínas são estáveis a 100 °C (Tabela 9.5) e muito sensíveis a mudanças de pH. Valores de pH próximos ao PI e associados ao calor provocam a precipitação da proteína.

Dependendo de certos fatores como *tempo*, *temperatura*, *teor de umidade* e *presença ou ausência de substâncias redutoras*, o calor pode ter efeitos *benéficos* (inativação de inibidores de proteína e outras enzimas, melhoria da digestibilidade da proteína, disponibilidade de aminoácidos e melhoria do *flavor*) ou *maléficos* (alteração de algumas ligações entre aminoácidos e formação de novas ligações entre aminoácidos e produtos indesejáveis).

Tabela 9.5 - Temperatura de coagulação de algumas proteínas

Proteína	Temperatura (°C)
Albumina do ovo	56
Albumina do soro (bovina)	67
Albumina do leite (bovina)	72
Legumelina (ervilha)	60
Betalactoglobulina (bovina)	70 - 75
Miosina (coelho)	47 - 56
Caseína (bovina)	160 - 200

As alterações que ocorrem com as proteínas relacionadas com o tratamento térmico, durante o processamento de alimento, podem ser assim resumidas:

- O tratamento térmico moderado (em torno de 100 °C) provoca a destruição de aminoácidos sensíveis como cistina/cisteína e lisina (reação de Maillard). Após o aquecimento moderado, as proteínas são mais facilmente digeridas, graças à alteração de sua conformação nativa, permitindo que as *proteases* atuem mais facilmente. Se as proteínas possuem atividade enzimática (lipases, lipoxigenases,

proteases e polifenóis oxidases, dentre outras), é provável que a alteração em sua estrutura terciária reduza ou, até mesmo, promova sua inativação, o que poderia provocar a formação de cores e sabores indesejáveis, bem como mudanças na textura dos alimentos.

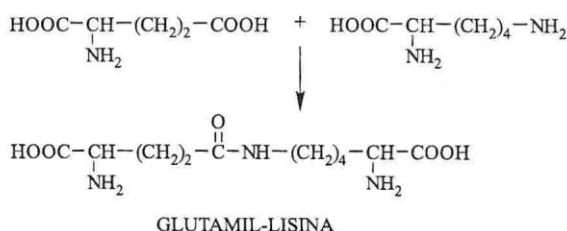
A temperatura e a duração do tratamento térmico são importantes para a proteína durante a secagem do alimento. O efeito negativo sobre a proteína ocorre durante o processo tradicional de secagem com a utilização direta de ar quente. A perda da água imobilizada, especialmente da camada monomolecular, provoca a desnaturação. Por exemplo, a desnaturação parcial da proteína do trigo pode ocorrer durante o aquecimento incorreto do grão. O grau de danos causados pela desnaturação aumenta com o teor de umidade, a temperatura e o tempo de aquecimento. O glúten desnaturado perde sua elasticidade e, portanto, não serve, por exemplo, para ser utilizado na fabricação de pão.

Geralmente, a solubilidade da proteína diminui com o aumento da temperatura e tempo de aquecimento, embora variações consideráveis existam entre proteínas.

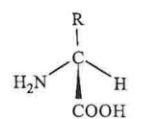
- A solubilidade da proteína e a coloração do alimento podem ser alteradas, durante o aquecimento, pela interação entre o grupo $\epsilon\text{-NH}_2$ da lisina e açúcares redutores (reação de Maillard) (Capítulo 11).
- No tratamento térmico mais severo ($>100^\circ\text{C}$), ligações isopeptídicas ou cruzadas (eq. 9.5) podem ser formadas. Estas ligações ocorrem entre o grupo $\epsilon\text{-NH}_2$ da lisina e o grupo amida do glutâmico ou aspártico, quando presentes no mesmo peptídeo ou na vizinhança, afetando a funcionabilidade e impedindo a digestão da proteína, o que diminui seu valor nutricional.
- Em temperatura acima de 180°C ($180\text{-}300^\circ\text{C}$), como ocorre em certos processamentos (torrefação de café, processamento de peixe e carne e fabricação de certos tipos de biscoito), ocorre a destruição de aminoácidos ou racemização (formação de aminoácidos na forma D). A presença de D-isômeros (eq. 9.6) reduz a digestibilidade da proteína, além de estes não serem utilizados na síntese de nova proteína.

As enzimas são estereoespecíficas e, na presença do substrato contendo D-aminoácido, ocasionam a formação de um intermediário não-reativo.

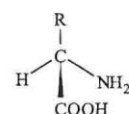
eq. 9.5



eq. 9.6



L-AMINOÁCIDO



D-AMINOÁCIDO

Propriedades Funcionais de Proteínas

A funcionalidade das proteínas é definida pelas propriedades física e química que afetam o seu comportamento no alimento durante o processamento, o armazenamento e a preparação. A utilização funcional de várias proteínas está listada na Tabela 9.6.

Tabela 9.6 - Propriedades funcionais de proteínas em alimentos e aplicações

Propriedade	Aplicação	Proteína
Emulsificação	Salsicha, sopas, café, molhos	Carne, leite, ovo
Hidratação	Salsicha, massa (pão, bolo)	Carne, ovo
Viscosidade	Sopas, molhos, sobremesa	Gelatina
Gel	Salsicha, bolo, queijo	Carne, ovo, leite
Espuma	Coberturas, bolos, sorvete	Ovo, leite
Coesão	Carne, salsicha, pasta	Carne, ovo, soro
Solubilidade	Bebidas	Soro

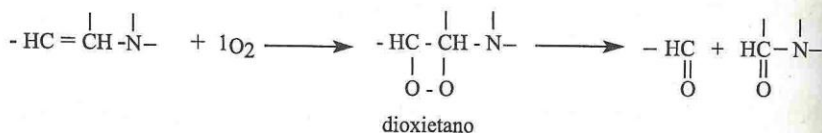
As propriedades física e química que ditam a funcionalidade da proteína são: a sua forma; composição e sequência de aminoácidos; carga líquida e sua distribuição; relação hidrofobicidade/hidrofiliicidade; estruturas primária, secundária, terciária e quaternária; flexibilidade/rigidez; e habilidade de reagir com outros componentes. Como as proteínas possuem uma variação enorme em suas propriedades química e física, torna-se muito difícil prever a utilização de cada uma com respeito a uma determinada propriedade funcional.

Reações da Proteína e Aminoácidos com as Espécies Reativas oriundas do Oxigênio (ERO_2)

As proteínas e aminoácidos são oxidados principalmente pelo radical hidroxil e pelo oxigênio singlete (cap. 1). Com os demais, *ânion superóxido e radical peroxil*, a reação de oxidação é lenta.

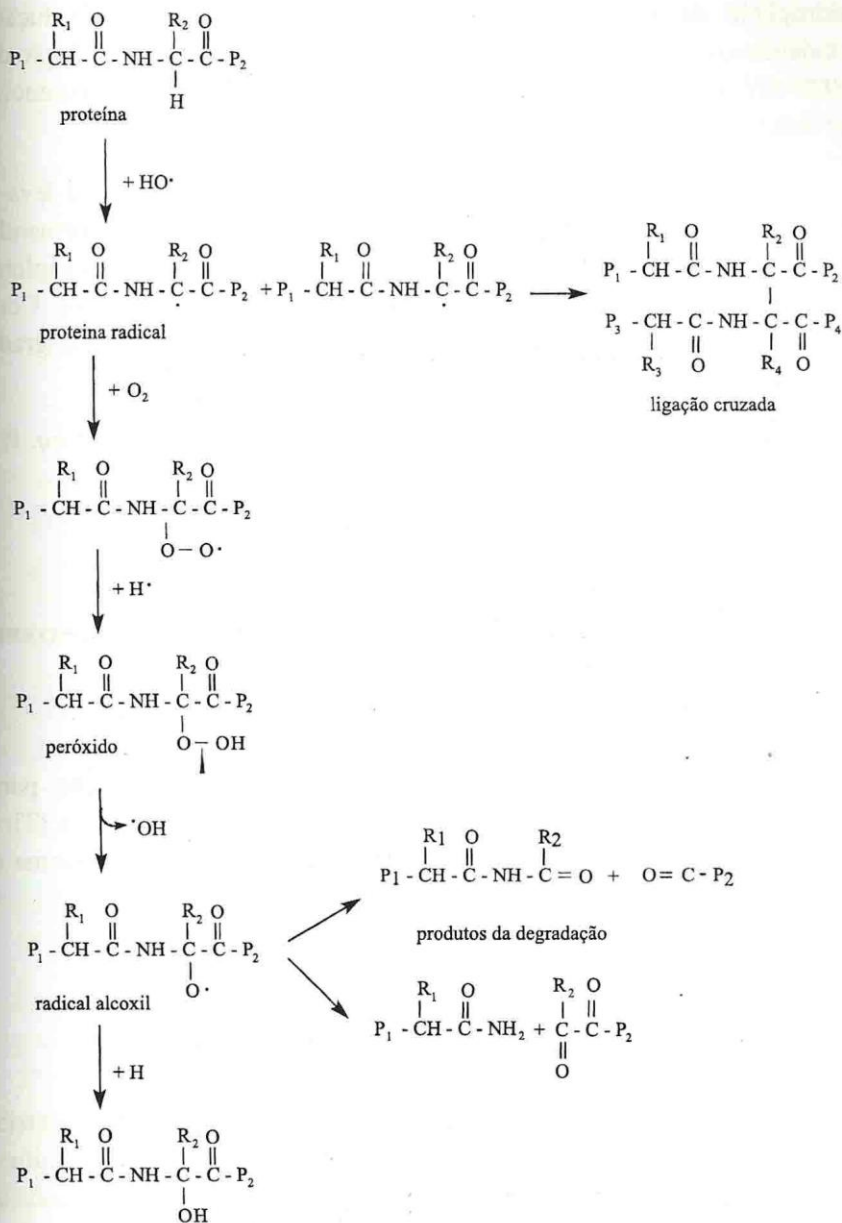
1 - Oxigênio singlete: essa reação de oxidação do oxigênio singlete com as proteínas contendo insaturação forma o dioxietano (eq. 9.7), o que é instável em temperatura ambiente, sendo facilmente decomposto pelo rompimento da ligação C – C para compostos carbonílicos.

eq. 9.7



2 - Radical hidroxil: a oxidação da proteína com radical hidroxil forma produtos contendo ligações cruzadas e compostos carbonílicos (eq. 9.8). Com seu elevado potencial de redução (2310 mV), remove hidrogênio da proteína (1000mV) formando radicais, que, interagem entre si formando produtos contendo ligações cruzadas. O radical oriundo da proteína pode também reagir com o oxigênio triplete formando o radical peroxil e, posteriormente, peróxido pela remoção de outro hidrogênio de outras moléculas. Os peróxidos oriundos da proteína podem ser facilmente decompostos para radical alcóxil pelo aquecimento ou na presença de íons metálicos de transição.

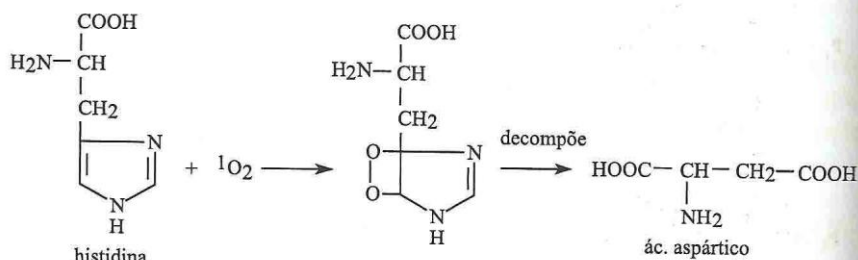
eq. 9.8



Os radicais oriundos da proteína e do aminoácido podem remover hidrogênio de outros aminoácidos de menor potencial de redução, oxidando-os. Por exemplo, radical triptofano com potencial de redução de 1020 mV, oxida a tirosina (930 mV), que oxida a cisteína com potencial de redução de 730 mV.

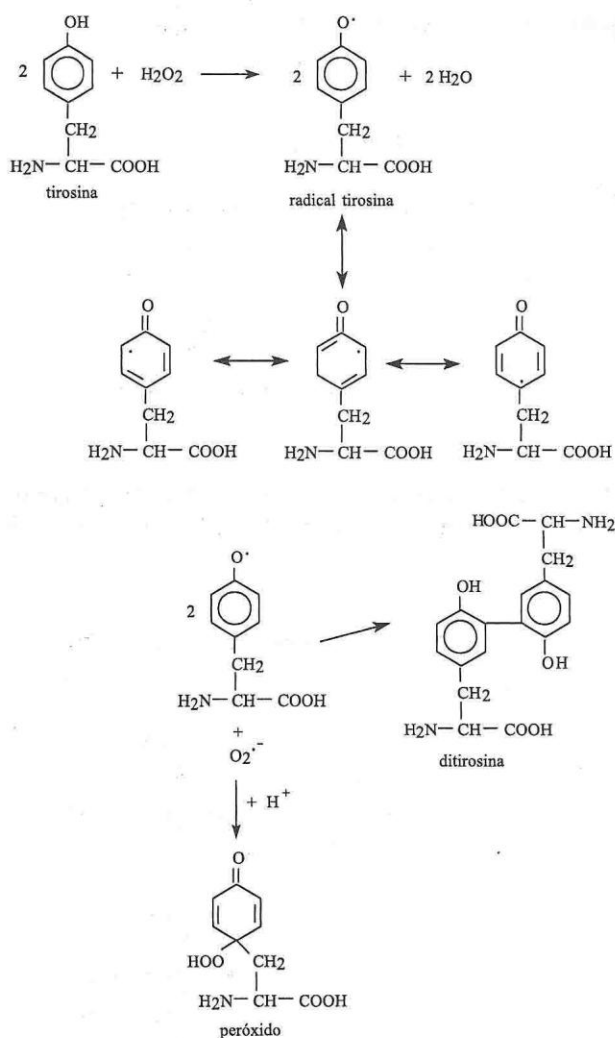
3 – *Histidina*: a oxidação da histidina pelo radical hidroxil leva à formação dos radicais histidina, os quais interagem entre si, formando produtos interligados. Podem também interagir com o oxigênio triplete, formando peróxido, que se decompõe para compostos carbonílicos. Com o oxigênio singlete, (eq. 9.9) histidina forma o dioxietano, que se degrada para ácido aspártico.

eq. 9.9



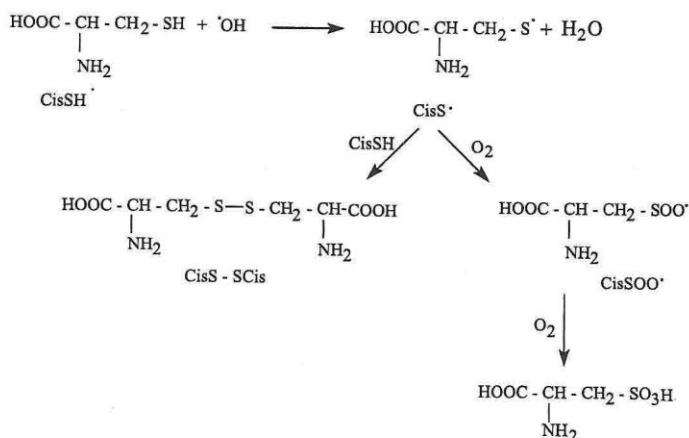
4 – *Tirosina*: o radical hidroxil promove a hidroxilação para deidrofenilalanina. Com a água oxigenada, forma o radical tirosina ($\text{Tir}^\bullet$) catalisada pela peroxidase, e na presença do radical superóxido forma o peróxido de tirosina (eq. 9.10).

eq. 9.10



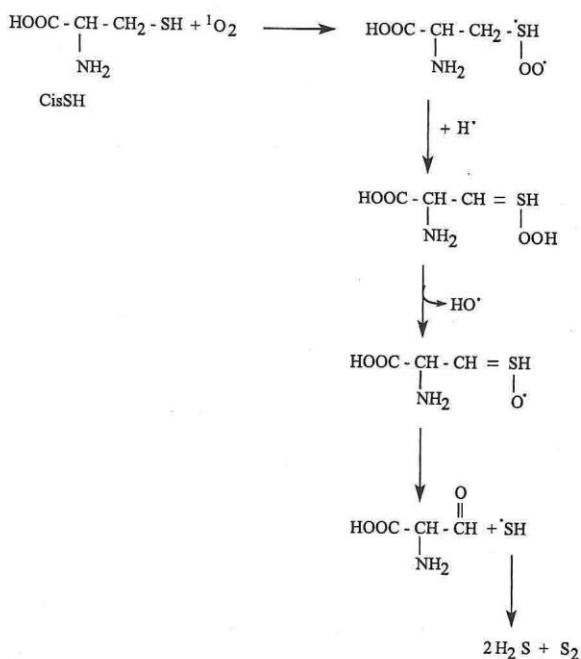
5 - Cisteína (Cis - SH) / Cistina (CisS - Scis) - o grupo tiol da cisteína forma o radical tiil (CisS[•]) pela ação do radical hidroxil, e o radical assim formado reage com outra molécula de cisteína, formando a cistina, ou oxidando para ácido sulfônico (eq. 9.11).

eq. 9.11



A cisteína pode também reagir com o oxigênio singlete, formando radical peróxil e, posteriormente, o sulfeto de hidrogênio (eq. 9.12).

eq. 9.12



Interação da Proteína com Lipídio

Lipídios ocorrem mais freqüentemente em alimentos em mistura com outras substâncias. Nestas misturas, os lipídios estão na forma livre ou ligados a várias substâncias não-lipídicas. Durante o processamento, parte dos lipídios passa da forma ligada para livre ou vice-versa. Os lipídios reagem diretamente com proteínas, formando as lipoproteínas (Figura 9.13). As ligações na interação proteína-lipídio são principalmente hidrofóbicas e, em menor extensão, as pontes de hidrogênio.

Os lipídios interagem não somente com proteínas, mas com outras biomacromoléculas hidrofílicas, como os carboidratos. Em panificação, a interação entre lipídios, amido e proteínas é importante na qualidade final do produto, evitando a retrogradação do amido.

Os produtos oriundos da oxidação de lipídios reagem com outros componentes do alimento durante o processamento e armazenamento. Lipoproteínas (Figura 9.13) são formadas durante a reação em que lipídios oxidados e proteínas são ligados parcialmente por pontes de hidrogênio e ligações co-valentes. Os peróxidos formados são rapidamente decompostos durante a reação, especialmente na presença de água, enquanto os aldeídos reagem mais lentamente.

Os peróxidos e, ou, produtos oriundos de sua degradação, formados durante a oxidação de lipídios (Capítulo 1), podem interagir com proteínas e aminoácidos, promovendo alterações adversas na solubilidade, atividade enzimática e qualidade nutricional da proteína. A sensibilidade ao peróxido depende dos seguintes fatores:

- 1 - Acesso ao aminoácido da superfície da molécula de proteína.
- 2 - Interação hidrofóbica ou pontes de hidrogênio entre a molécula do lipídio e a superfície da proteína, resultando na aproximação dos reagentes e na exposição da cadeia lateral dos aminoácidos localizados no interior da proteína.

Vários produtos são formados quando as proteínas são expostas ao lipídio oxidado, e o resultado dessa interação se verifica na mudança da textura, diminuição da solubilidade (formação de ligações cruzadas),

coloração (escurecimento) e diminuição do valor nutricional (destruição do triptofano, oxidação da metionina para sulfóxido e interação com a lisina, tornando-a indisponível).

Os radicais livres formados a partir da decomposição do peróxido removem átomos de hidrogênio da proteína (eq. 9.13), preferencialmente dos aminoácidos Tri, His, Lis, Arg, Cys/Cis e Met; e os radicais livres oriundos da proteína interagem entre si, resultando na formação de ligações cruzadas, e eventualmente polimerizam-se, formando agregados insolúveis.

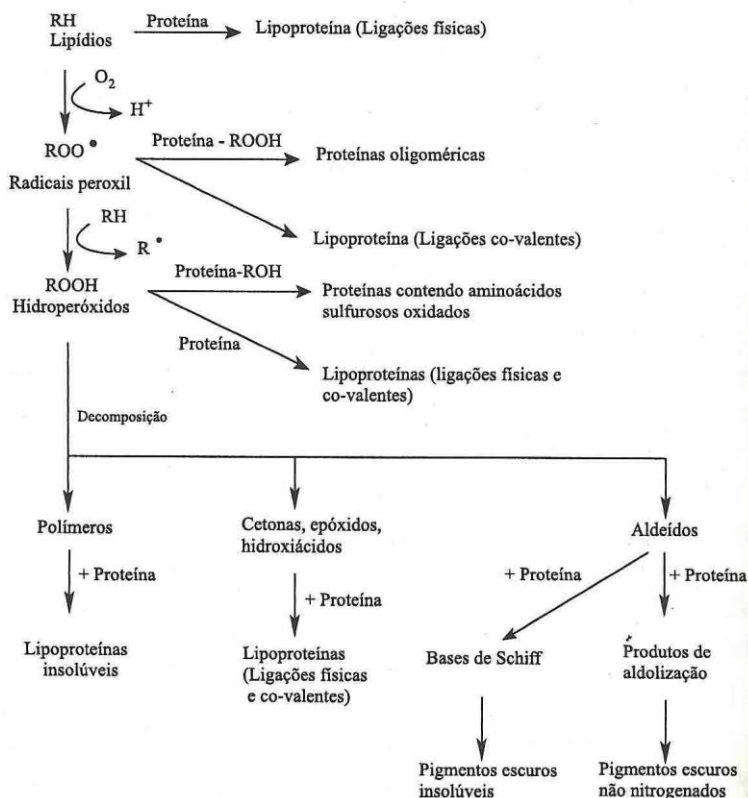
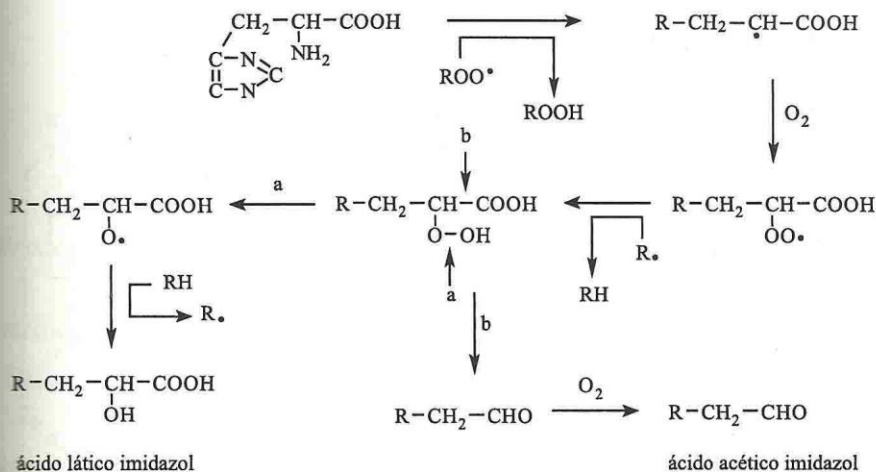


Figura 9.13 - Interação da proteína com lipídios oxidados.

No tecido animal, em nível de membrana celular, a fração lipídica encontra-se intimamente ligada à proteína. Diversas interações, como

pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e ponte salina via metal divalente, ocorrem entre o fosfolipídio e a proteína (Figura 9.14).

eq. 9.13



POLIMERIZAÇÃO



↓
radical livre (proteína)

LIGAÇÃO CRUZADA



↓
radical livre (lipídio)

As interações dos fosfolipídios com proteínas ocorrem por meio de forças eletrostáticas, envolvendo o grupo fosfato negativamente carregado e os grupamentos da proteína positivamente carregados, como *lisil* ou *guanidil*; ou pelo envolvimento de grupos carregados positivamente do fosfolipídio (colina) com grupos negativos, como *aspartil*.

O complexo proteína-lipídio influencia as propriedades de vários tipos de alimentos. Por exemplo, no tecido animal, a alteração da proteína provocada pela hidrólise ou pela oxidação do lipídio acarreta mudanças

na funcionalidade – textura, capacidade de retenção de água, solubilidade – e no *flavor*.

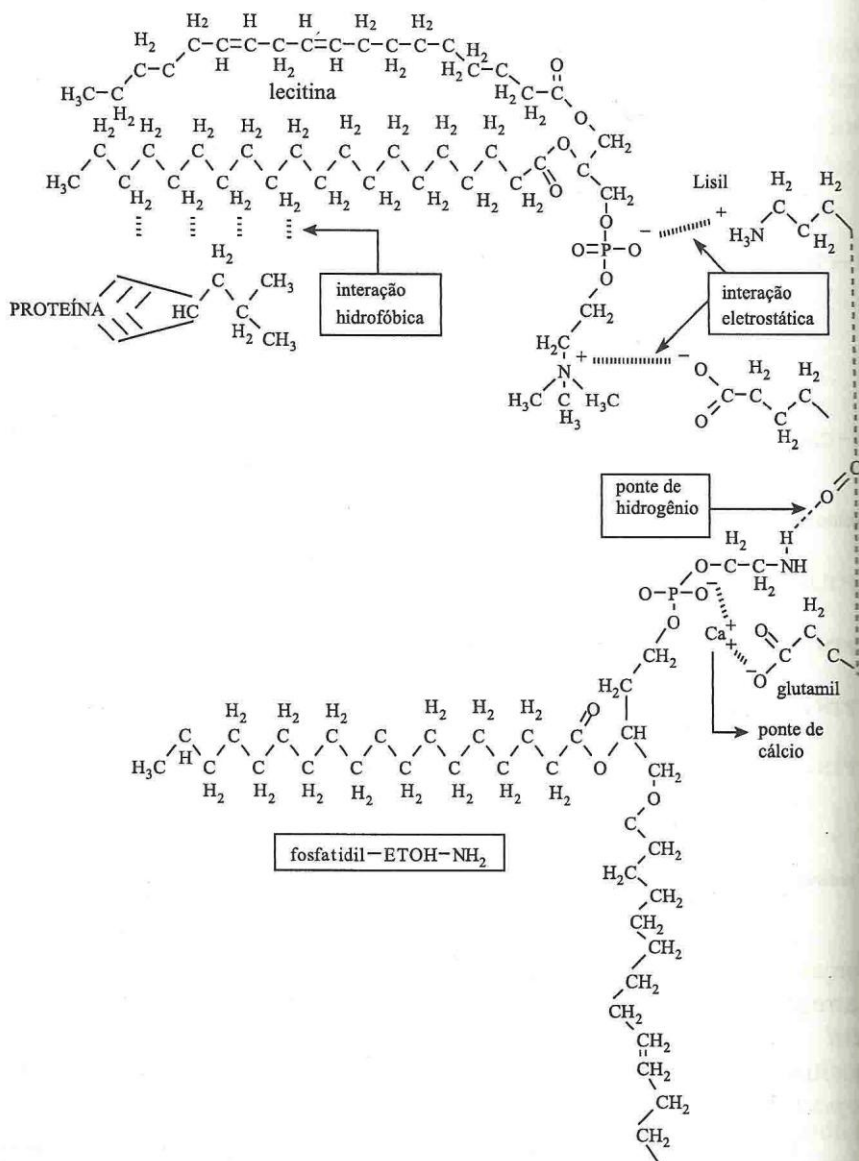


Figura 9.14 - Interação proteína-fosfolipídio.

Extração, Determinação do PI e Solubilidade

Reagentes

- Leite desnatado e farinha de soja desengordurada (FSD).
- HCl, NaOH e H_2SO_4 (5,0%).
- Ác. láctico 10% e TCA 15%.
- MgSO_4 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- Solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH = 7,0.

Procedimento

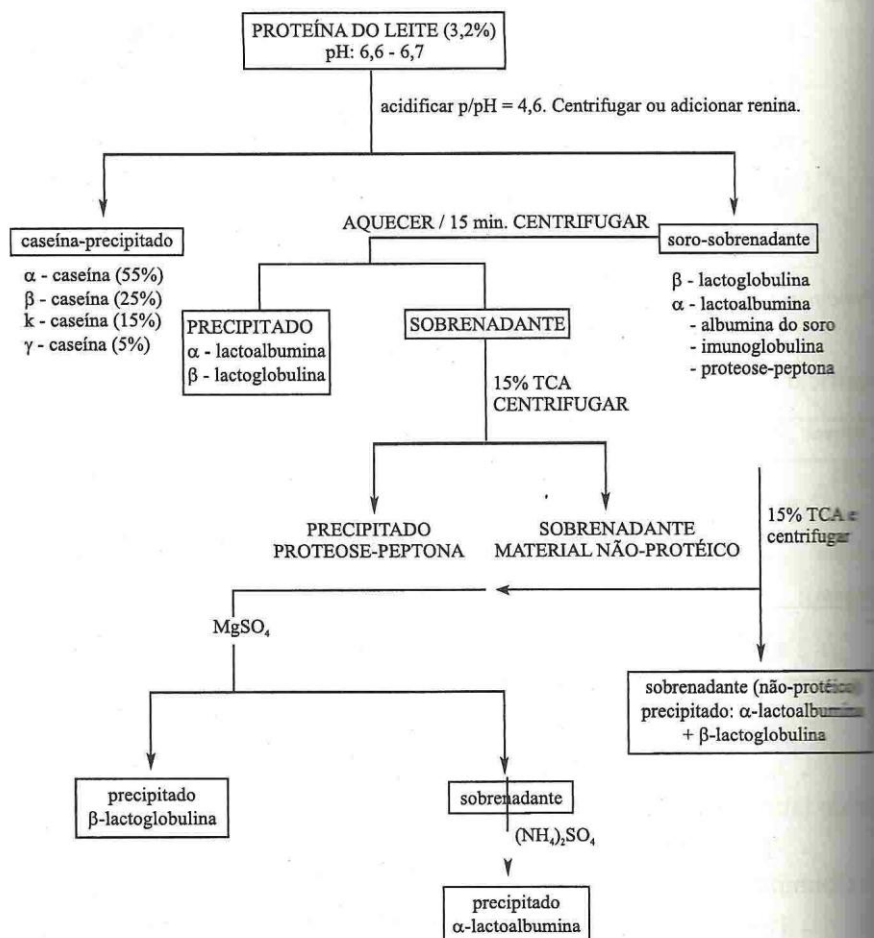
1 - Determinar o PI da caseína conforme os dados abaixo e verificar a turbidez e precipitação no decorrer do tempo:

Béquers	1	2	3	4	5	6	7	8
pH	6,0	5,5	5,3	5,0	4,7	4,4	4,1	3,5
0 min								
10 min								
30 min								

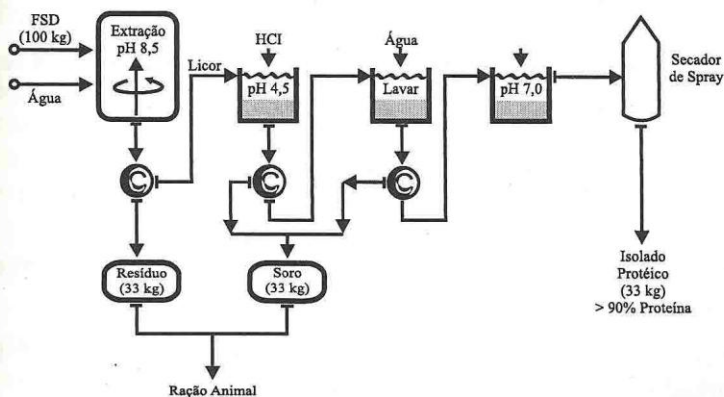
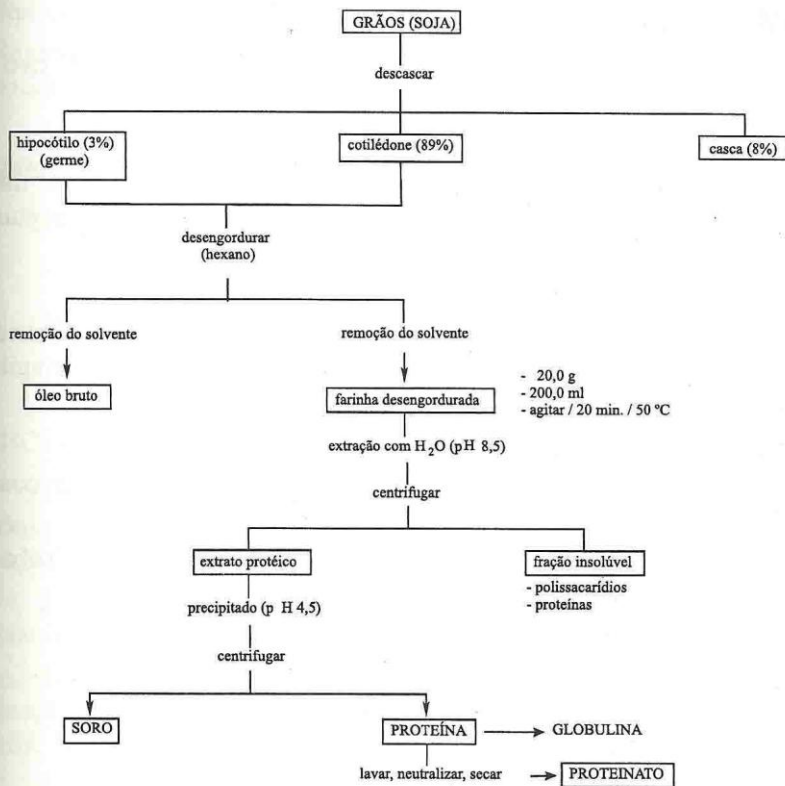
2 - Extrair as proteínas do leite conforme o procedimento abaixo e explicar os princípios envolvidos em cada etapa.

- Transferir 400 ml de leite desnatado para o béquer.
- Aquecer a 40 °C e adicionar lentamente (bureta), com agitação, ácido láctico 10% até a formação do precipitado (caseína).
- Titular o filtrado com solução de 15% TCA: globulina + albumina.
- Tomar 50 ml do soro, adicionar 50 ml de água, aquecer a 30 °C e saturar com MgSO_4 (40 g): globulina.
- Diluir 50 ml do soro com a mesma quantidade de água, aquecer – mantendo a 30 °C – e saturar com cristais de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (80 g); o precipitado formado é uma mistura de globulina e lactoalbumina.
- Diluir 50 ml do soro com volume igual de uma solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH = 7,0 e deixar em repouso durante uma hora.

- Filtrar o precipitado (globulina) e ao sobrenadante adicionar, gota a gota, H_2SO_4 (5,0%) até a formação do precipitado (albumina).



3 - Extrair a globulina da soja conforme o procedimento a seguir e explicar os princípios envolvidos na extração:



Efeito do Aquecimento sobre as Proteínas

Procedimento

- 1 - Preparar 100 ml de uma solução 10% (v/v) de clara de ovo em água destilada.
 - 2 - Filtrar, para remover membranas opacas.
 - 3 - Tomar cinco tubos de ensaio e pipetar para cada 5,0 ml da solução, colocando cada tubo em banho-maria, nas seguintes temperaturas: 55, 60, 63, 65 e 68 °C.
 - 4 - Resfriar os tubos em água fria (torneira).
 - 5 - Determinar a absorbância das amostras a 450 nm, utilizando a solução (1) não aquecida para zerar o aparelho. Não esquecer de agitar o tubo antes da leitura.
- Descrever a aparência das soluções.
 - Fazer o gráfico temperatura x absorbância e comparar com as observações visuais.
 - Com os resultados, qual é o efeito do aquecimento sobre as proteínas?

Efeito do pH na Hidratação de Proteínas

Procedimento

- 1 - Marcar e pesar seis tubos plásticos de centrífuga.
- 2 - Transferir 3 g de carne moída para cada tubo, homogeneizá-los e, em seguida, adicionar 15 ml de água destilada.
- 3 - Ajustar o pH de cada tubo com NaOH ou HCl para os seguintes valores:
Tubo 1 - pH 4,0 Tubo 4 - pH 5,5
Tubo 2 - pH 4,5 Tubo 5 - pH 6,0
Tubo 3 - pH 5,0 Tubo 6 - pH 7,0
- 4 - Checar novamente o pH de cada tubo após 10 min e centrifugar por 10 min a 2.000 rpm (~ 1.500 g).
- 5 - Após a centrifugação, decantar o supernadante e pesar o precipitado.

- Qual o efeito do pH sobre o peso do precipitado obtido?
- Como isto se relaciona com a hidratação das proteínas do músculo?
- Explicar e ilustrar as alterações químicas responsáveis por esses efeitos.
- Reproduzir graficamente (pH x peso do precipitado) e explicar a capacidade de retenção de água da carne.

EXERCÍCIOS

1 - Calcular a força iônica das seguintes soluções:

- 1,0 M KCl, 0,1 M de acetato de sódio e 0,1 M MgSO_4 .

- 0,1 M Na_2SO_4 , 0,1 M K_2HPO_4 , 0,02 M Fe_2SO_4 e 1 M MgSO_4 .

- 0,02 M Fe_2SO_4 e 1 M MgSO_4 .

- Mistura contendo a seguinte solução em quantidades iguais: 0,05 M HCl + 0,1 M K_2HPO_4 .

2 - Uma solução foi preparada, dissolvendo-se 8,4 g de sulfato de amônia (PM = 132,14) em 35,0 ml de água. Qual a força iônica desta solução?

3 - Os solventes orgânicos promovem a desnaturação de proteínas, prevenindo a interação iônica. Certo? Errado? Explicar.

4 - A formação de pontes de hidrogênio internas é a principal interação que mantém a molécula de proteína em seu estado nativo. Certo? Errado? Explicar.

5 - Quais dos seguintes aminoácidos estão, provavelmente, no interior e na parte externa de uma proteína globular em solução de pH = 7,0: Glu, Arg, Val, Phe, Ile, Met, Asn, Lis, Ser e Tre?

6 - Proteínas são polímeros de aminoácidos ligados por ligações peptídicas. Em solução aquosa (pH = 7,0), as proteínas, em sua maioria, se encontram em sua forma nativa, de modo que os aminoácidos não-polares se localizam na parte interna da cadeia, enquanto os aminoácidos polares, em grande parte, se concentram na parte externa, em contato com a água.

Observando as estruturas dos aminoácidos contidos na Figura 9.3, responder:

- Dos seguintes aminoácidos, quais provavelmente se encontram na parte externa ou interna de uma proteína globular em solução Val, Pro, Phe, Asp, Ile, His e Lis?

ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO

Introdução

Quando a maioria das frutas e dos vegetais é amassada, cortada ou triturada, rapidamente se torna escura. Esta descoloração é oriunda de reações catalisadas por uma enzima genericamente conhecida como polifenol oxidase (PPO). A ação desta enzima em várias frutas e vegetais *in natura* acarreta perdas econômicas consideráveis, além de diminuição da qualidade nutritiva, alterações do sabor e aparência menos atrativa desses alimentos.

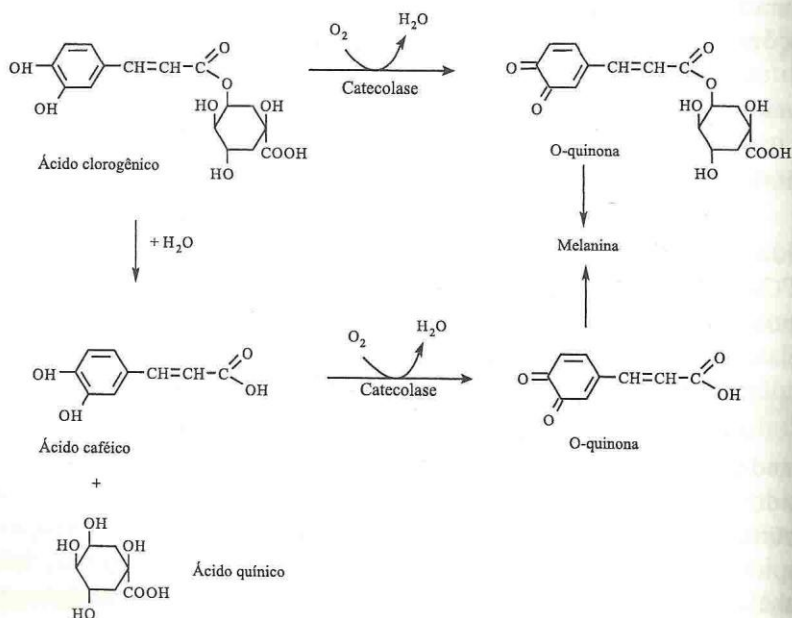
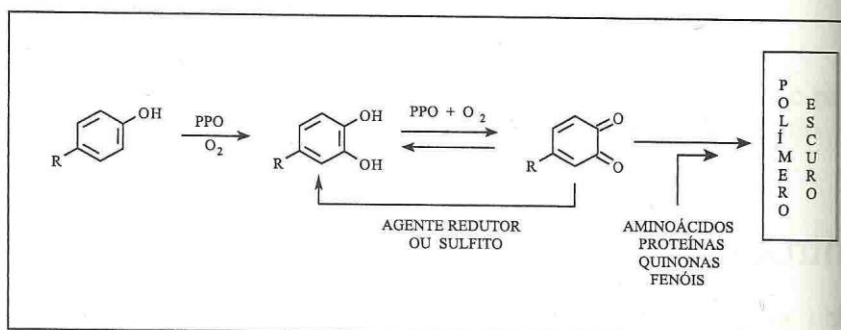
O escurecimento de frutas e de certos vegetais é iniciado pela oxidação enzimática de compostos fenólicos pelas polifenóis oxidases (PPOs). O produto inicial da oxidação é a quinona, que rapidamente se condensa, formando pigmentos escuros insolúveis, denominados melanina (eq. 10.1), ou reage não-enzimaticamente com outros compostos fenólicos, aminoácidos e proteínas, formando também melanina.

As reações de escurecimento enzimático ocorrem no tecido vegetal quando há ruptura da célula e a reação não é controlada, embora, no tecido intacto de frutas e vegetais, possa também ocorrer o escurecimento, como, por exemplo, em situações de inibição da respiração durante o armazenamento em atmosfera controlada, uso de embalagem imprópria, deficiência de ácido ascórbico no tecido vegetal, armazenamento a frio e radiação ionizante.

A reação de escurecimento em frutas, vegetais e bebidas é um dos principais problemas na indústria de alimentos. Estima-se que em torno de 50,0% da perda de frutas tropicais no mundo é devida à enzima polifenol oxidase. A ação desta enzima resulta na formação de pigmentos

escuras, freqüentemente acompanhados de mudanças indesejáveis na aparência e nas propriedades organolépticas do produto, resultando na diminuição da vida útil e do valor de mercado.

eq. 10.1



A O-quinona formada pode interagir com grupos *amina* e *tiol*, reduzindo a disponibilidade da lisina, metionina, tiamina e de outros nutrientes essenciais. Os substratos mais comuns em tecidos vegetais são a tirosina e o ácido clorogênico (Quadro 10.1).

A enzima PPO é encontrada praticamente em todos os tecidos vegetais, em concentrações especialmente altas em cogumelo, batata, pêssago, maçã, banana, manga, folhas de chá, abacate e café. Sua atividade pode ser variada em função da variedade, do estágio de maturação e das condições de cultivo; tão logo ocorra a ruptura do tecido, inicia-se a reação de escurecimento.

Quadro 10.1 - Substratos endógenos para PPO em vegetais

Produto	Substrato
Banana	3,4-diidroxifeniletilamina (dopamina)
Maçã	Ácido clorogênico, O-catequina
Cacau	Catequinas
Café	Ácido clorogênico, ácido caféico
Berinjela	Ácido caféico, ácido cinâmico
Alface	Tirosina
Cogumelo	Tirosina
Batata	Tirosina, ácido clorogênico, flavonóides
Chá	Flavonóides, catequinas, taninos
Pêssego	Taninos
Pêra	Ácido clorogênico

Embora indesejável na maioria dos casos, em virtude da alteração da coloração, perda de nutrientes e formação de sabor indesejável, o escurecimento oxidativo em chá, café, cacau e ameixa seca é desejável. Graças à especificidade de vários substratos, a enzima PPO é, às vezes, denominada *tirosinase*, *polifenolase*, *fenolase*, *catecol oxidase*, *catecolase* e *cresolase*. A enzima ocorre também em animais, e o substrato é a tirosina, responsável pela cor da pele (melanina).

Mecanismo da Ação Enzimática

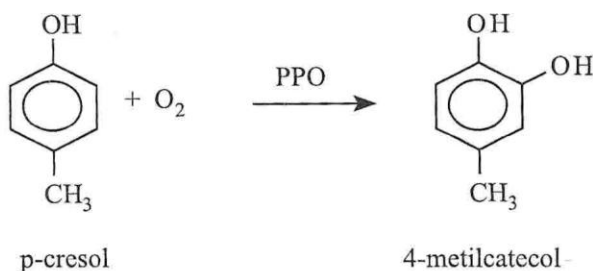
A polifenol oxidase está presente em algumas bactérias e fungos, na maioria das plantas, em alguns artrópodes e nos mamíferos.

Em todos esses casos, a enzima está associada à pigmentação escura do organismo.

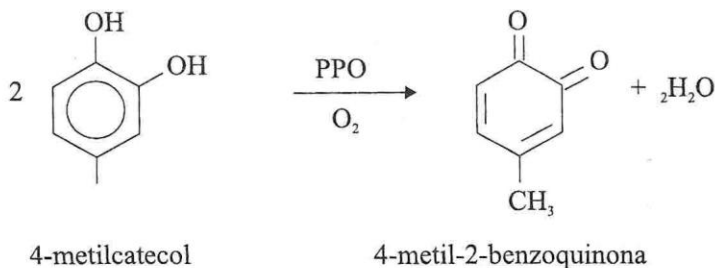
O PM para as diferentes PPOs varia de 57 a 62 Kda, à exceção da a PPO de cogumelo, com PM de 128 Kda. Todas possuem habilidade para converter a forma O-diidroxifenol em O-benzoquinona, utilizando o oxigênio como substrato secundário (atividade catecolase), mas nem todas as PPOs são capazes de hidroxilar os monofenóis.

A enzima polifenol oxidase (1,2-benzenodiol:oxigênio oxidorreductase) possui cobre (Cu^{++}) no centro ativo e funciona como oxidases de função mista, catalisando dois diferentes tipos de reação:

(1) *Monooxygenase*, que atua na hidroxilação de monofenóis para diidroxifenóis:



(2) *Oxidase*, que atua oxidando os difenóis para o-quinona:



A formação da quinona é dependente do oxigênio e da enzima. Uma vez formadas, as reações subseqüentes ocorrem espontaneamente, não dependendo mais da enzima nem do oxigênio. Em geral, a configuração química mais apropriada para a atividade da PPO (Figura 10.1) é a estrutura o-diidroxilada, resultando em reação mais rápida.

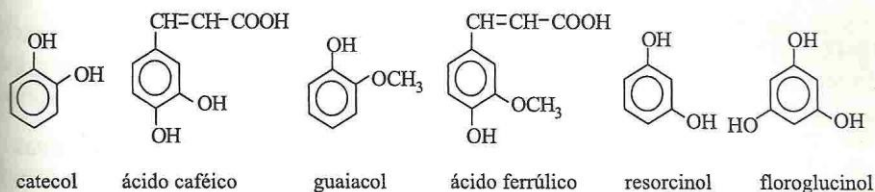


Figura 10.1 - Compostos fenólicos encontrados em vegetais.

Os derivados contendo *metil* não funcionam como substratos para as PPOs. Em contraste com os o-difenóis, os m-difenóis são raramente utilizados como substratos e alguns deles possuem efeito inibitório.

Métodos de Controle

Várias maneiras de inibição da PPO são conhecidas, muito embora os métodos utilizados pelas indústrias sejam relativamente poucos. Isto se deve ao aparecimento de *flavor* desagradável e toxidez e a questões econômicas. Três componentes devem estar presentes para que a reação de escurecimento enzimático ocorra: *enzima*, *substrato* e *oxigênio*. No caso de ausência ou bloqueio na participação de um destes na reação (seja por agentes redutores, temperatura ou abaixamento do pH), esta não prosseguirá.

O pH ótimo de atuação da PPO varia com a fonte da enzima e a natureza do substrato. Na maioria dos casos, o pH ótimo de atuação encontra-se na faixa entre 6 e 7, sendo a enzima inativada em pH 4,0 ou abaixo.

O escurecimento enzimático é uma reação oxidativa que pode ser retardada eliminando-se o oxigênio da superfície danificada do vegetal. Entretanto, isto nem sempre é possível, ocorrendo escurecimento tão logo o oxigênio seja reincorporado. Portanto, a maneira mais prática de prevenir o escurecimento é a adição de agentes químicos capazes de bloquear a reação (eq. 10.1). Essas substâncias atuam diretamente sobre a enzima ou sobre os intermediários da formação do pigmento.

Durante a preparação de diversas frutas e diversos vegetais para enlatamento ou para outras operações de processamento, a prevenção de escurecimento catalisada por enzimas é o principal problema. Infelizmente, a

maioria dos inibidores enzimáticos discutidos a seguir não são adequados ou eficientes para uso em alimentos. O escurecimento de frutas e vegetais catalisados pela PPO pode ser prevenido de várias formas:

(1) Inativação térmica da enzima pelo uso do calor, embora algumas sejam relativamente termoestáveis (meia-vida de 12 min a 70 °C). Além disso, é necessário tomar algumas providências para prevenir o escurecimento oxidativo, até que ocorra a desnaturação da enzima.

(2) Exclusão ou remoção de um ou ambos os substratos (oxigênio – atmosfera controlada, embalagens adequadas e fenóis – adição de ciclodextrinas em sucos).

(3) Redução do pH em duas ou mais unidades abaixo do pH ótimo (~6,0), pela adição de ácido cítrico, por exemplo.

(4) Adição de substâncias redutoras que inibam a ação da PPO ou previnam a formação da melanina.

Substâncias redutoras, como ácido ascórbico, sulfito e tióis, previnem o escurecimento, pela redução do O-benzoquinona de volta para a forma o-diidroxifenol ou pela inativação irreversível da PPO, sendo, portanto, consumidas no processo. O sulfito, além de atuar como agente redutor, pode também interagir com a quinona, formando sulfoquinona, ou, irreversivelmente, inibir a enzima. Problemas de corrosão e aparecimento de sabor estranho podem ocorrer, se utilizado em excesso. Mais recentemente, tem sido implicado no aparecimento de algumas formas de asma. Mesmo assim, sulfitos e, ou, ascorbatos são os mais utilizados no controle do escurecimento em operações de processamento de alimentos.

Em contraste, compostos sulfidrilas (-SH) combinam-se quimicamente com o-quinonas, formando produto estável e incolor, prevenindo adicional oxidação e, conseqüentemente, pigmentos escuros.

O ácido ascórbico e seus derivados, utilizados isoladamente ou em combinação com ácido cítrico, são muito empregados na prevenção do escurecimento oxidativo em sucos, antes da pasteurização. Em maçã, a polifenol oxidase se encontra ligada a partículas suspensas no suco; portanto, a centrifugação ou filtração elimina a possibilidade de escurecimento. Entretanto, para prevenir o escurecimento do suco antes da etapa de clarificação, é necessário imergir a maçã fatiada/cortada em solução de 1% de ácido ascórbico antes da extração. O produto final, embalado com o mínimo de espaço livre, mantém-se inalterado por

diversas semanas em condições de refrigeração, até que se torne amarelado, em razão do escurecimento não-enzimático ocasionado pela adição do ácido ascórbico.

De forma semelhante, o sulfito é utilizado no controle do escurecimento de frutas e vegetais antes da secagem. O tratamento do alho amassado com ácido cítrico (10 g/l), mantido sob refrigeração (4 °C), é efetivo no controle do escurecimento oxidativo. A banana e o abacate tratados com L-cisteína na concentração 5,0 e 0,32 mM, respectivamente, proporcionam 100% de inibição do escurecimento.

Dentre as substâncias químicas redutoras de uso mais freqüente na indústria de alimentos, o *sulfito* é o mais utilizado. Os agentes redutores (sulfito e ácido ascórbico) promovem a redução química dos precursores do pigmento (eq. 10.1). Tal efeito é temporário, graças à oxidação irreversível desses agentes na reação, os quais, não sendo específicos, podem provocar mudanças na coloração e no *flavor*.

A utilização de sulfito em níveis adequado antes da desidratação, além de inibir as reações de escurecimento permite a utilização de temperaturas mais elevadas, diminuindo o tempo do processo de secagem além de aumentar a vida de prateleira do produto. Alternativamente, os eritorbatos (ácido eritórbito, eritorbato de sódio) funcionam de maneira similar: são agentes redutores (preferencialmente reduzido no produto), portanto, prevenindo ou minimizando a oxidação do sabor e odor e a deterioração da cor.

Aplicação do calor

A PPO não pertence à classe de enzimas termorresistentes. Exposição por curto período de tempo do tecido em temperatura de 70 a 90°C é suficiente, na maioria dos casos, para a destruição completa de suas funções catalíticas. A aplicação do calor em alimentos (temperatura elevada por tempo adequado) inativa a PPO e todas as outras enzimas. O aquecimento aplicado no processamento (branqueamento, temperatura elevada/tempo curto) é utilizado em pré-tratamentos de frutas e vegetais para enlatamento, congelamento e desidratação.

Diversos problemas aparecem em função do uso do calor. Frutas e vegetais tornam-se cozidos, e isto leva a mudanças desfavoráveis na textura e no desenvolvimento de *flavor* desagradável. Existe, entretanto,

uma relação muito próxima entre a temperatura e o tempo com respeito ao aquecimento do alimento. Tais fatores, entretanto, dependem da quantidade de enzima no produto e do pH deste.

Aplicação do dióxido de enxofre e sulfito

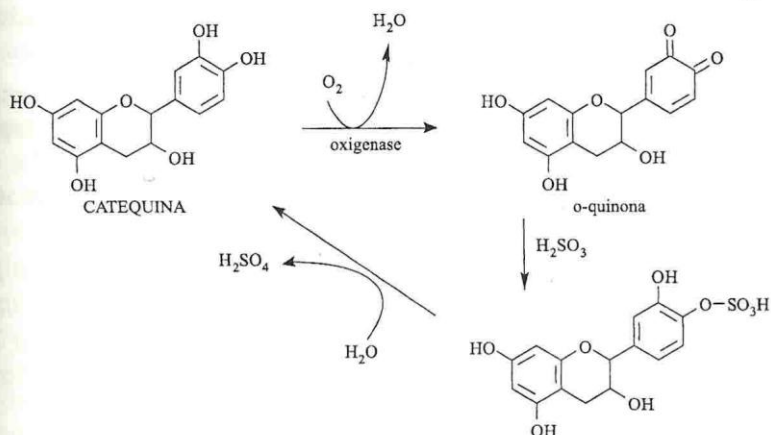
Numerosas reações catalisadas por enzimas podem ser inibidas pelo sulfito, incluindo *PPO*, *lipoxigenase* e *ascorbato oxidase*. O sulfito não inibe irreversivelmente o escurecimento enzimático, de forma que a concentração requerida é também dependente do período de tempo em que a reação deve estar sob controle. Por exemplo, o nível de sulfito necessário para prevenir o escurecimento enzimático depende da natureza do substrato disponível. Quando somente monofenóis como a tirosina estão presentes, quantidades menores de sulfito são suficientes; (*batata* é um exemplo desta situação). Quando difenóis estão presentes, concentrações de sulfito mais elevadas são necessárias (exemplo desta situação seria o abacate). O processo de inibição, portanto, consome o sulfito, conferindo temporária proteção à descoloração, a menos que utilizado em alta concentração.

A polifenoloxidase catalisa a oxidação de mono e orto-difenóis para quinonas, com subsequente interação com grupos aminas, formando pigmentos escuros. O mecanismo da ação do sulfito na prevenção do escurecimento enzimático não é bem conhecido, mas provavelmente envolve diferentes tipos de ações:

a) Inibição direta sobre a enzima.

b) Interação direta com intermediários formados durante a ação enzimática, impedindo sua participação na reação de formação do pigmento escuro. Por exemplo, o sulfito pode combinar com a quinona, bloqueando sua participação em oxidação e condensação adicionais (eq. 10.2). De forma alternativa, o sulfito pode atuar simplesmente como agente redutor (eq. 10.1), retornando a quinona para a forma de fenol reduzido.

eq. 10.2



O sulfito evita a oxidação do ascorbato pela ascorbato oxidase e outras enzimas. Os níveis de ascorbato diminuem rapidamente após a maceração do tecido vegetal graças à ação da ascorbato oxidase. A adição de sulfito, conseqüentemente, previne a destruição do ascorbato. A lipoxigenase pode ser também inibida pela ação do sulfito, evitando a formação de *flavor* desagradável durante o armazenamento de vegetais.

Em alguns produtos, o sulfito atua como antioxidante, muito embora não seja utilizado com este propósito; em cerveja, inibe o desenvolvimento do *flavor* oxidado durante o armazenamento. O dióxido de enxofre, ou sulfito – geralmente sulfito de sódio, bissulfito de sódio e metabissulfito de sódio –, é poderoso inibidor das PPOs (na forma de gás ou de solução). Pode ser utilizado em casos em que a aplicação do calor resulta em mudanças desfavoráveis da textura e no desenvolvimento de *flavor* estranho ao produto.

A injúria mecânica do tubérculo induz a formação de pigmentos indesejáveis causados pela enzima polifenol oxidase sobre a tirosina. Além da formação de produtos escuros, a ação física sobre os tubérculos leva também ao aumento da biosíntese de glicoalcalóides. Estes eventos são as principais causas da perda do produto.

Batatas imersas em solução de sulfito (0,5-1,0%), em pH 5,3-6,0, efetivamente reduzem o escurecimento. Em geral, o escurecimento enzimático se torna problemático quando não são processadas imediatamente. No processamento comercial, a temperatura de fritura

destrói as enzimas rapidamente, portanto, previne a descoloração não havendo necessidade de sulfitação. Tubérculos descascados ou fatiados se não processados imediatamente necessitam de tratamento com sulfito.

O escurecimento que ocorre após fritura deve-se à reação entre o ferro com compostos fenólicos di-hidroxilados. O ácido clorogênico é o principal composto fenólico envolvido nesta reação. O controle com sulfito, EDTA e ácido pirofosfato de sódio são muito utilizados no processamento industrial.

O sulfito contém propriedades antissépticas e ajuda na preservação da vitamina C. Por outro lado, sua utilização pode resultar em *flavor* desagradável, degradação da cor natural do alimento (Capítulo 13), destruição da vitamina B₁ e corrosão da embalagem (lata), sendo tóxico se usado em níveis elevados.

Escurecimento de Frutas/vegetais

Durante o processamento de frutas e vegetais, ocorrem diversos tipos de reações oxidativas, nas quais elétrons são removidos de átomos/moléculas com formação de formas oxidadas. Essas reações provocam o escurecimento, a perda ou alterações do *flavor* e odor, alterações da textura e perda do valor nutritivo pela destruição de vitaminas e ácidos graxos essenciais. Quatro categorias de estrutura química são utilizadas para estabilizar as frutas e vegetais:

- removedores de radicais livres como os tocoferóis;
- agentes redutores e removedores de oxigênio, como o ácido ascórbico e derivados;
- agentes complexantes como ácido cítrico; e
- outros antioxidantes secundários, como os carotenóides.

De todos, os mais importantes para prevenir alterações oxidativas em frutas e vegetais são os agentes redutores e certos complexantes.

Em alimentos, existem quatro tipos principais de escurecimento: *Maillard*, *caramelização*, *oxidação do ácido ascórbico* e *enzimática*. Algumas frutas (pêssego, maçã, banana e uva) não podem ser submetidas ao branqueamento em razão da delicadeza de seus tecidos, que podem ser rompidos durante o processo. O calor desnatura a enzima, afetando a textura, o sabor e o aroma típicos do produto. Neste caso, tratamentos

alternativos são utilizados na prevenção do escurecimento oxidativo, especialmente durante o descascamento e os cortes.

O branqueamento de frutas ou *cozimento parcial* é uma etapa importante no processamento. O produto é geralmente imerso em água quente (88 a 99 °C) ou exposto ao vapor. É uma operação que consome em torno de 1/3 do total de energia requerida no processamento. A maioria dos nutrientes solúveis em água, como ácido ascórbico, é perdida nesta operação. Durante o branqueamento, é imperativo que certas enzimas capazes de alterar o *flavor* e a textura sejam inativadas. O processo envolve um rápido tratamento térmico aplicado à maioria dos vegetais e também a algumas frutas, com o intuito de inativar enzimas oxidativas como a catalase, peroxidase, polifenoloxidase, ascorbato oxidase e lipoxigenase, a remoção de gases entre os tecidos e a diminuição da carga bacteriana.

Quando o tecido não-branqueado é rompido e exposto ao ar, essas enzimas entram em contato com o substrato provocando o amolecimento, a descoloração e a produção de *flavor* estranho. A extensão do escurecimento depende da quantidade total de compostos fenólicos no tecido e do nível de atividade da enzima polifenoloxidase. Diferenças entre cultivares de determinada espécie, quanto ao escurecimento potencial em resposta à injúria mecânica, estão relacionadas à variação do teor de compostos fenólicos totais e à atividade da polifenoloxidase do cultivar.

O método de controle mais comumente utilizado é a aplicação do sulfito. Soluções de 200 a 400 ppm podem ser utilizadas na imersão de frutas por 2 a 5 minutos ou na forma de gás em câmara de fumigação. Os níveis residuais permitidos variam até 300 ppm em sucos e 2.000 ppm em frutas secas. A forma não-dissociada (cap. 8) é que possui ação germicida. Com $pK = 1,81$, significa que muito pouco é ativo em alimentos com $pH > 3,5$. As leveduras são mais resistentes ao SO_2 que a maioria das espécies de bactérias e fungos. Na indústria de vinho, níveis elevados de sulfito (1.200 a 2.000 $mg.L^{-1}$) são utilizados na preservação do suco de uva em temperatura ambiente. Após armazenamento, quando utilizado para a fermentação, parte do sulfito é removido pelo aquecimento rápido associado com borbulhamento de nitrogênio.

Alternativas para o sulfito no processamento de alimentos

1 - *Eritorbatos (ácido eritórbito e eritorbato de sódio)* – são estereoisômeros do ácido ascórbico. A diferença entre os eritorbatos e ascórbico ocorre na configuração dos grupos $-OH$ e $-H$ localizados no carbono 5 (Figura 10.2). Os eritorbatos têm atividades antioxidantes similares, diferindo-se na atividade vitamínica. Possuem de 5 a 7% da potência antiescorbútica do ascorbato, devido à baixa absorção e retenção pelos tecidos. Por apresentarem custos menores, a sua aplicação em produtos em que a atividade de vitamina C não é importante, mas se faz necessário o efeito antioxidante, os eritorbatos são o produto de escolha.

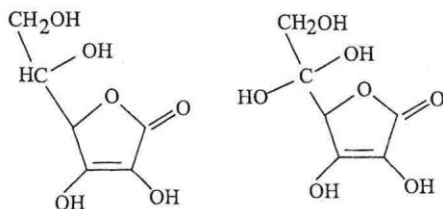


Figura 10.2 - Estrutura química do ácido eritórbito e ascórbico.

Tal como o sulfito, os eritorbatos são agentes redutores, pois reduzem a reativa orto-quinona de volta para a forma difenólica. Como substituto do sulfito e do ácido ascórbico no controle do escurecimento em diversos alimentos, são utilizados em frutas *in natura*, processadas e em frutas fatiadas, congeladas, saladas de vegetais, sucos de frutas, batatas e bebidas (cerveja e vinho). A combinação do ácido eritórbito e ácido cítrico é comumente utilizada. A adição do ácido cítrico ajuda a baixar o pH e atua na complexação do cobre, ocasionando a inibição da PPO.

2 - *Ácidos* – a utilização de ácidos tem a finalidade de aumentar a acidez, incluindo ácido cítrico, fumárico, tartárico, acético, fosfórico e ascórbico. As superfícies cortadas de frutas podem ser protegidas do escurecimento por imersão em solução 1-2 % de ácido cítrico. Entretanto, nem sempre é possível abaixar tanto o pH do alimento devido ao significativo sabor ácido resultante, sendo incompatível com as propriedades sensoriais e tecnológicas do produto final.

3 - *Agentes complexantes* (EDTA, fosfatos e ácido cítrico) – podem complexar com o cobre presente no centro ativo ou reduzir o nível

disponível da enzima, diminuindo a velocidade da reação enzimática, mas não inibe completamente o escurecimento.

4 - *Antioxidante* – o ácido ascórbico é comumente utilizado na maioria dos sucos e enlatados de frutas. É um efetivo inibidor da peroxidase, podendo também ser utilizado em misturas com o ácido cítrico e com o xarope. O ácido cítrico participa como estabilizador do ácido ascórbico. Atua reduzindo a O-quinona, gerada pela polifenoloxidase durante a oxidação dos polifenóis, de volta a compostos fenólicos, prevenindo sua conversão para pigmentos escuros.

5 - *Açúcar* – o principal propósito do açúcar é adoçar a fruta, mas é também usado para prevenir o escurecimento de frutas descascadas e fatiadas, pois inibe a oxidação excluindo parcialmente o oxigênio dos tecidos e aumenta com a elevação do pH. Em várias situações, o açúcar é misturado com o ácido ascórbico e cítrico como agente efetivo da manutenção da textura, cor e *flavor*.

Frutas e vegetais minimamente processados

Em frutas e vegetais *minimamente processados*, um dos principais problemas que limita o desenvolvimento desta tecnologia é a ocorrência do escurecimento enzimático, tornando o problema especialmente difícil, em razão da proibição da utilização do sulfito em produtos *in natura*. Outra importante enzima é a lipoxigenase, que catalisa a oxidação de ácidos graxos polinsaturados, causando a formação de numerosas substâncias de *flavor* desagradável (cap. 1).

O processamento mínimo tem o propósito de oferecer o produto de forma conveniente, sem a perda da qualidade e vida de prateleira suficiente de forma a facilitar sua distribuição. As características microbiológicas, sensoriais e nutricionais devem ser compatíveis por períodos de no mínimo quatro a sete dias, mas preferencialmente por um período mais longo, dependendo do mercado. As perdas do ácido ascórbico e de carotenos são o principal fator limitante da qualidade nutricional.

As deteriorações dos produtos minimamente processados ocorrem em razão das alterações fisiológicas (produção de etileno, respiração), bioquímicas (PPO, lipoxigenase) e microbiológicas, resultando na degradação da cor, textura e *flavor*. Conservantes podem ser utilizados

diretamente na água de lavagem, com o intuito de reduzir o número de microorganismos e retardar a atividade enzimática. A utilização de 100- L^{-1} de cloro ou ácido cítrico, antes e depois do descascamento e cortes de frutas e vegetais, é efetiva para se estender a vida útil desses produtos. Quando se utiliza o cloro, o produto deve ser novamente lavado para reduzir sua concentração. Como alternativa ao cloro, pode-se utilizar H_2O_2 , e o resíduo pode ser eliminado tanto pela lavagem ou pela ação de catalase endógena, evitando-se a reação da água oxigenada com os constituintes do alimento.

O tratamento da superfície é necessário para prevenir os processos degradativos. O tempo de imersão entre 1 e 5 minutos é comumente utilizado. O pH baixo é também recomendado em razão da atividade antimicrobiológica. Os produtos minimamente processados com $\text{pH} > 4,6$ e $a_w > 0,85$ são altamente perecíveis quando não submetidos a processos de conservação. Portanto, a acidificação da superfície é recomendada, sendo o ácido cítrico muito utilizado para esse propósito.

Durante o manuseio e armazenamento, o cogumelo *in natura* está sujeito a severo escurecimento enzimático. A imersão em solução contendo inibidores do escurecimento acelera a sua deterioração, em razão da grande absorção de água, favorecendo o crescimento bacteriano. A aplicação de cloro ($\sim 20\text{ppm}$) na forma de solução de hipoclorito de sódio ou de cálcio é a forma utilizada no controle. Entretanto, a oxidação não-enzimática dos substratos da enzima PPO na concentração bactericida utilizada de cloro forma intermediários do escurecimento enzimático, ocorrendo descoloração.

A utilização da solução de cloro em baixas concentrações ($< 17,5\text{ ppm}$) inibe a atuação da enzima, prevenindo o escurecimento enzimático em maçã, batata e vagens. Entretanto, a sua utilização em alimentos é questionada. De forma alternativa ao cloro, o controle do escurecimento pode ser obtido pela utilização da mistura contendo 4,5% eritorbato de sódio + 0,1% cisteína-HCl + 100 ppm EDTA ajustada para pH 5,5 com NaOH 10%.

Em batatas pré-processadas, a descoloração ocorre em poucos minutos se não forem adicionadas substâncias antiescurecimento. O uso de sulfito não é permitido, embora seja altamente eficaz. A utilização ($45^\circ\text{C}/20\text{ min}$) da mistura quente de 1,0% de ácido ascórbico + 2,0% de

ácido cítrico representa alternativa viável ao sulfito, quando armazenado a 4 °C por 14 dias.

Dentre os compostos utilizados para inibir a atividade da PPO, os mais utilizados são: sulfito, ácido ascórbico e seus derivados (*ácido eritórbito* e *eritorbato de sódio*) e compostos contendo SH (L-cisteína, N-acetil-L-cisteína, etil ou metil L-cisteína e glutatona reduzida). O dióxido de enxofre é o mais efetivo inibidor e, portanto, muito utilizado. Entretanto, sua utilização tem sido desaconselhada em razão da sensibilidade de indivíduos asmáticos.

As alternativas para a indústria de alimentos são formulações contendo ácido ascórbico e cítrico, embora sejam menos efetivos que o SO_2 . O ácido ascórbico é rapidamente consumido no processo de redução da quinona formada pela ação da PPO sobre o substrato (Figura 10.3). A utilização de compostos sulfidrilas é tão efetivo quanto o sulfito no controle do escurecimento em frutas e vegetais. Entretanto, em alguns casos, quando se utiliza a cisteína na prevenção do escurecimento, é necessário ajustar o pH próximo à neutralidade; caso contrário, ocorre o aparecimento de coloração avermelhada no produto.

Em banana e abacate minimamente processados, a utilização da L-cisteína na concentração de 5,0 mM e 0,32 mM, respectivamente, promove 100% de inibição. O mecanismo de inibição do escurecimento envolvendo a L-cisteína é controverso, e duas opiniões existem: *a inibição resulta da formação do conjugado entre a quinona e a cisteína; ou a cisteína pode diretamente inibir a enzima combinando irreversivelmente com o cobre presente no centro ativo da PPO.*

Em alguns tipos de sucos, a enzima PPO encontra-se ligada às partículas suspensas, tornando o produto opaco. A remoção da opacidade por filtração ou centrifugação elimina o escurecimento enzimático. A clarificação previne o escurecimento do suco *in natura* refrigerado por diversas semanas. Entretanto, após longo período de armazenamento, desenvolve a coloração amarelo-escura, devido ao escurecimento não-enzimático do ácido ascórbico. Portanto, a utilização da vitamina C em produtos minimamente processados pode resultar em descoloração não-enzimática. Isto pode ser amenizado, reduzindo-se o nível do ácido ascórbico adicionado e armazenado com o mínimo de espaço livre.

A turbidez de sucos pode também ser causada pela presença de íons metálicos provenientes de tubulações e de embalagens. Os níveis

considerados normais de ferro e cobre em sucos varia de 3,7 mg. kg⁻¹ e 0,2 mg. kg⁻¹, respectivamente; acima destes valores (> 5x), podem então causar a turbidez. Para testar a presença destes elementos, devem-se preparar as seguintes soluções:

a) *Solução de ferrocianeto de potássio* – Dissolver 0,5 g em 100mL de água destilada. A presença de cobre pode ser detectada visualmente, adicionando-se 2,0 mL da solução em 20 mL de suco e observando a presença de flóculos vermelho-escuros, indicativo de teste positivo.

b) *Solução 3N HCl* – Diluir 258 mL HCl 36% em 1,0 L de água. Adicionar 2,0 mL da solução em 20 mL de suco e observar a formação da coloração azul.

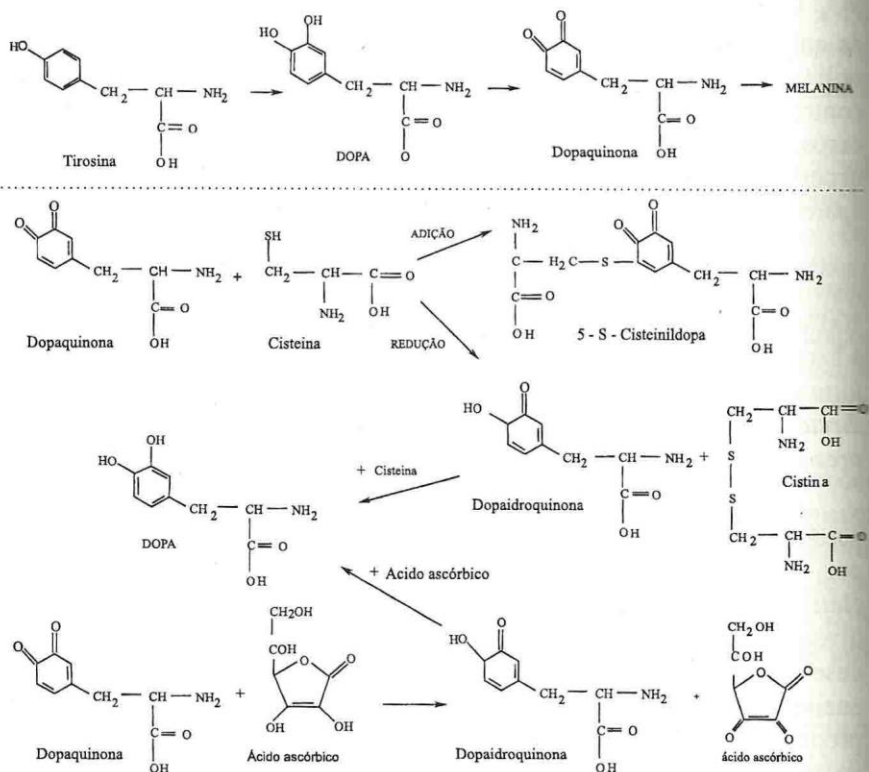


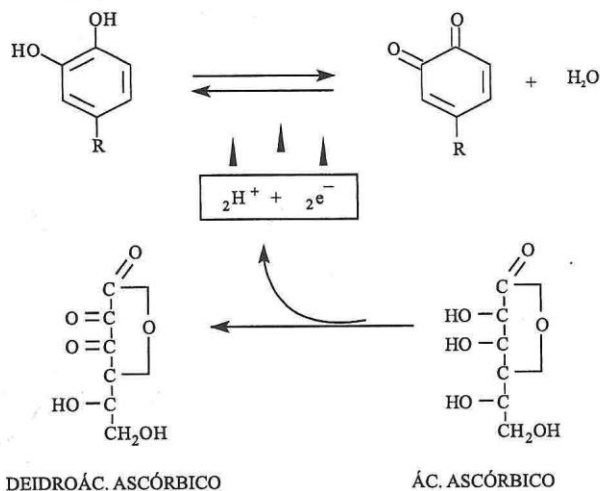
Figura 10.3 - Inibição da PPO pela remoção do intermediário dopaquinona pela L-cisteína ou ácido ascórbico.

Aplicação de ácidos

Os ácidos normalmente aplicados estão entre aqueles de ocorrência natural: cítrico, fosfórico, málico e ascórbico. Em geral, sua ação dá-se pelo abaixamento do pH do tecido, diminuindo, assim, a velocidade da reação de escurecimento. O pH ótimo de atuação da PPO está entre 6 e 7, e abaixo de 3,0 não há virtualmente nenhuma atividade enzimática.

O ácido cítrico, em conjunto com o ácido ascórbico ou o sulfito de sódio, é muito utilizado como inibidor químico do escurecimento enzimático. Também, apresenta efeito inibitório duplo sobre as PPOs não somente pelo abaixamento do pH do meio, mas também complexando com o cobre do centro ativo da enzima. Entretanto, o ácido cítrico por si só não é muito efetivo como inibidor das PPOs. O ácido málico é muito mais efetivo, e o ascórbico apresenta efeito inibidor muito mais acentuado (eq. 10.4).

eq. 10.4



O ácido ascórbico é preferencialmente oxidado em relação aos outros substratos, e, tão logo seja consumido, ocorre o escurecimento; portanto, o produto deve ser tratado com quantidades adequadas de ácido ascórbico, caso contrário seu efeito é mínimo, em face de sua oxidação. Quantidades de até 300 mg de ácido ascórbico/500 g controlam o

escurecimento e reduzem o oxigênio dissolvido no espaço livre em frutas enlatadas.

O ácido ascórbico é efetivo quando adicionado a produtos congelados e sucos e frutas enlatados evitando a descoloração e o desenvolvimento de sabor estranho (Tabela 10.1). A adição do ácido ascórbico previne a descoloração de carnes curada, fresca e moída mantidas sob refrigeração. O tratamento da carne fresca tanto por imersão ou spray com a solução de ácido ascórbico retarda a descoloração e a oxidação de lipídios. Em carne curada, o ácido ascórbico catalisa a formação da nitrosomioglobina (cap. 8); aumenta a formação do óxido nítrico, reduzindo o nível do nitrito residual; e protege o pigmento da carne curada (nitrosomiocromo) da oxidação, além de prevenir a formação de nitrosaminas.

Tabela 10.1 - Níveis de ácido ascórbico utilizado em diversos produtos.

Produto	Níveis (%)
Suco de frutas	0,005 – 0,02
Refrescos	0,005 – 0,03
Óleo de citrus	0,01
Vinho	0,005 – 0,015
Cerveja	0,002 – 0,006
Frutas congeladas	0,03 – 0,045
Frutas enlatadas	0,025 – 0,04
Vegetais enlatados	0,1
Carne fresca	0,02 – 0,05
Carne curada	0,02 – 0,05
Leite em pó	0,02 – 0,2

O escurecimento de batata, por exemplo, pode ser controlado utilizando-se a seguinte solução: 0,2% de sorbato de potássio, 0,3 a 1,0% de ácido cítrico, e 0,3 a 1,0% de ácido ascórbico. As batatas descascadas são imersas na solução durante o tempo de um minuto e podem ser armazenadas a 4 °C em embalagens plásticas por 20 dias.

Remoção do oxigênio

A enzima PPO requer oxigênio para iniciar a reação de escurecimento. Portanto, procedimentos capazes de eliminar ou de evitar o contato do produto com o oxigênio, como a utilização de embalagens impermeáveis, a exclusão do oxigênio em sucos e bebidas pelo nitrogênio e a prevenção do acesso do oxigênio aos tecidos provocado por danos mecânicos durante o transporte e armazenamento de frutas, são úteis na prevenção do escurecimento.

Utilização da Vitamina C em Processamento de Alimentos

1 - Prevenção do escurecimento em frutas e vegetais. Na presença do ácido ascórbico, os compostos do tipo O-quinona são reduzidos para a forma fenólica (eq. 10.3). Após a exaustão do ácido ascórbico, as O-quinonas se acumulam e polimerizam, formando pigmentos escuros.

2 - Inibição da oxidação em cerveja, vinho, leite e derivados.

3 - Estabilização da coloração em carnes e fixação da cor em carnes curadas. O ácido ascórbico atua como redutor na formação do óxido nitroso e da nitrosomioglobina (cap. 8).

4 - Melhoria das características reológicas da massa. A adição de 2 a 6 g de ácido ascórbico/100 kg de farinha melhora a força e o volume da massa (elasticidade e retenção de gás). O efeito do ácido ascórbico está relacionado com a rápida conversão da glutathione (GSH) endógena para a forma de dissulfeto durante a movimentação da massa. O glúten se torna mais macio na presença da glutathione, uma vez que as moléculas da proteína (PTN-SS-PTN) são despolimerizadas pela troca dos grupos tiol/dissulfeto (eq. 10.5).

eq. 10.5



Com a adição do ácido ascórbico, parte desta glutathione é removida da reação, resultando em glúten mais forte e, conseqüentemente, mais resistente. O efeito do ácido ascórbico ocorre em dois estádios (Figura 10.4). Primeiro, é oxidado para deidro ácido ascórbico pelo oxigênio

presente na massa. Esta reação é catalisada por traços de íons metálicos ou compostos heme, como enzimas catalase e peroxidase. O segundo estágio é a oxidação da glutatona para a forma dissulfeto pelo DAA, catalisada pela glutatona deidrogenase presente na farinha.

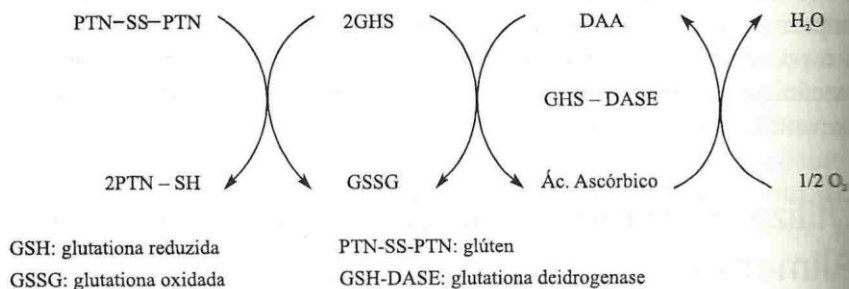


Figura 10.4 - Competição pela oxidação de grupos tióis entre a vitamina C e a proteína da farinha.

De forma semelhante, o bromato de potássio é, às vezes, utilizado para o mesmo propósito (Figura 10.5).

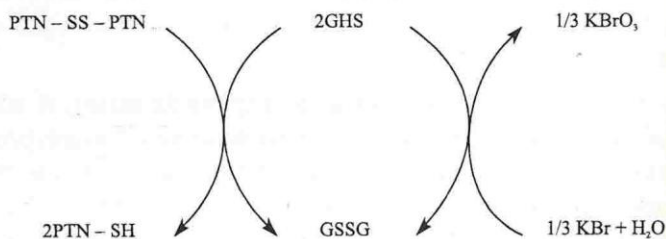


Figura 10.5 - Competição pela oxidação de grupos tióis entre o bromato de potássio e a proteína da farinha.

PPO: Atividade e Controle

Reagentes

- Solução-tampão: pH = 4,0 , pH = 6,0 e pH = 8,0.
- Solução: catecol 1,0%, ác. cítrico 0,1%, ác. ascórbico 0,1% e ~~ác.~~ acético 0,1% e 1,0%.

- Bissulfito de sódio e ácido ascórbico.
- Fluoreto de sódio 0,05 M.

Procedimento

- Descascar e extrair a parte central da maçã; homogeneizá-la em liquidificador com 250 ml de água gelada. Filtrar e manter o filtrado em béquer com gelo. Os procedimentos subsequentes devem ser realizados rapidamente.

Parte A – Tomar três tubos de ensaio e adicionar:

TUBO 1: 1 ml da solução-tampão; pH = 6,0 + 10 gotas da solução de catecol + 5 ml do filtrado de maçã. Colocar o tubo em água fervente durante 10 min.

TUBO 2: idem ao tubo 1, mas deixar em gelo (béquer).

TUBO 3: idem ao tubo 1, mas deixar em temperatura ambiente.

Parte B – Tomar cinco tubos de ensaio e deixar em repouso, em temperatura ambiente/1 h:

TUBO 1: 5 ml de água + 5 ml de filtrado de maçã e agitar.

TUBO 2: 5 ml de tampão; pH = 4 + 5 ml de filtrado e agitar.

TUBO 3: 5 ml tampão pH = 8,0 + 5 ml de filtrado e agitar.

TUBO 4: 5 mg de NaHSO_3 + 5 ml de filtrado e agitar.

TUBO 5: 5 mg de ácido ascórbico + 5 ml de filtrado e agitar.

- Descrever as mudanças de coloração.
- Discutir o efeito do catecol na parte A.
- Discutir os efeitos do pH, do inibidor e dos agentes redutores sobre a atividade da PPO nos tubos da parte B.

Parte C – Tomar 20 g de batata, triturar em mortar com areia, na presença de 100 ml de fluoreto de sódio 0,05 M (cuidado, é tóxico), e filtrar rapidamente. O filtrado será utilizado como fonte de PPO, conforme dados a seguir:

Tubo*	Enzima**	Água	0,01 M Catecol
1	2 ml	1 ml	(controle)
2	2 ml	-	1 ml
3	1 ml	1 ml	2 ml
4	1 ml	-	2 ml
5	0,5 ml	1,5 ml	1 ml

* = triplicatas e ** = filtrado.

- Agitar (por quê?) a cada cinco minutos e acompanhar a reação durante 30 min.

- Comentar as diferenças visualizadas com as alterações na quantidade de enzima.

- Tomar cinco tubos e testar diferentes tipos de substratos (0,01 M) em substituição ao catecol: resorcinol, fenol, hidroquinona, pirogalol etc., utilizando os mesmos dados anteriores. Correlacionar a estrutura destes substratos com a atividade da PPO.

- Tomar cinco tubos e verificar o efeito dos seguintes inibidores (todos a 10^{-3} M): ác. ascórbico, NaHSO_3 e NaCl .

Parte D – Tomar cinco béqueres e identificá-los conforme os dados abaixo:

1 = ác. ascórbico 0,1%;

2 = ác. cítrico 0,1%;

3 = ác. acético 0,1%;

4 = ác. acético 1,0%; e

5 = água.

- Adicionar quantidades suficientes da solução em cada béquer, de forma a manter o pedaço da amostra submerso.

- Descascar e extrair a parte central da maçã e dividir em seis partes aproximadamente iguais.

- Mergulhar, com auxílio de uma pinça, os pedaços de maçã nas soluções, deixando em repouso durante 1 minuto; remover os pedaços e deixar sobre uma toalha de papel.

- Lavar a pinça com água sempre que mudar para outra solução.
- Deixar a amostra submersa no béquer que contém água.
- Utilizar como controle amostra deixada ao ar livre.
- Observar o escurecimento das amostras após 5, 10, 20 e 30 min, e responder às questões seguintes:

1 - Qual o propósito específico de utilizar os ácidos ascórbico, cítrico e acético?

2 - Por que o pedaço de maçã mantido imerso em água não escureceu tão rapidamente quanto o deixado ao ar livre?

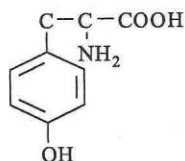
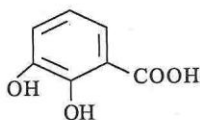
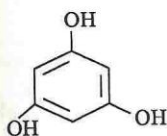
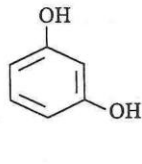
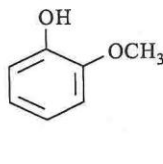
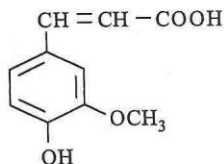
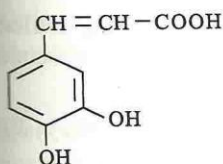
3 - O que você pode concluir a respeito da eficiência das soluções utilizadas na prevenção do escurecimento?

EXERCÍCIOS

1 - A partir do 4-metilcatecol, mostrar como o sulfito e a vitamina C controlam a reação de escurecimento catalisada pela PPO.

2 - Quais substratos da PPO estão presentes na maçã e na batata?

3 - Em geral, a configuração química dos compostos fenólicos é importante para a reação catalisada pela PPO. Das configurações abaixo, predizer qual(is) pode(m) ser utilizada(s) como substrato.



ESCURECIMENTO NÃO-ENZIMÁTICO

Introdução

A intensidade das reações de escurecimento não-enzimático em alimentos depende da quantidade e do tipo de carboidratos presentes e, em menor extensão, de proteínas e aminoácidos. O escurecimento não-enzimático é o resultado da descoloração provocada pela reação entre a *carbonila* e os *grupos amina livres*, com formação do pigmento denominado *melanoidina*. Muito embora a reação de escurecimento não-oxidativa ocorra principalmente entre *açúcares redutores* e *aminoácidos ou proteínas*, a degradação do açúcar, bem como a degradação oxidativa do ácido ascórbico e a adicional condensação com compostos carbonílicos formados ou com grupos amina presentes, produz pigmentos escuros.

As reações de escurecimento não-enzimático em alimentos estão associadas com o aquecimento e armazenamento e podem ser divididas em três mecanismos (Quadro 11.1).

Quadro 11.1 - Mecanismos das reações de escurecimento não-enzimático

Mecanismo	Req. O ₂	Req. NH ₂	pH Ótimo	Prod. final
Maillard	-	+	Alcalino	Melanoidina
Caramelização	-	-	Alcalino/ácido	Caramelo
Oxidação Vit. C	+	-	Ligeiram./ácido	Melanoidina

De modo geral, essas reações são indesejáveis do ponto de vista nutricional e estético. Em alguns produtos, a reação é desejável quando leva à melhoria da aparência e do *flavor*: *crosta do pão* (destruição de 70% da lisina), *café torrado*, *chocolate*, *cerveja*, *carne de peixe assado*, porém indesejável em produtos como *leite e derivados* (destruição da lisina durante tratamento térmico), *sucos*, *vegetais*, *produtos desidratados e concentrados*, *cereais e derivados* (destruição da lisina durante a secagem).

As reações de escurecimento não-enzimático, além de produzir *flavor* agradável, aroma e coloração, em certas condições podem formar coloração e *flavor* indesejáveis e alterar a qualidade do alimento durante o processamento e armazenamento.

Estas reações provocam significantes perdas de certos aminoácidos (lisina, arginina, histidina e triptofano), diminuição da digestibilidade da proteína e, portanto, redução do valor nutritivo, formação de alguns inibidores e compostos tóxicos. Alimentos ricos em açúcares redutores são muito reativos, mas outros fatores influenciam a reação, como *temperatura*, *pH*, *umidade*, *tipos de açúcar e amina*, O_2 e SO_2 .

A velocidade da reação é influenciada pela natureza dos componentes reativos (AAs, proteína, peptídio e açúcares). Isto significa que cada tipo de alimento pode apresentar um escurecimento específico. Geralmente, a *lisina* é o aminoácido mais reativo, em razão da presença do grupo amina ϵ livre.

Reação de Maillard

Reação envolvendo aldeído (açúcar redutor) e grupos amina de aminoácidos, peptídios e proteínas em seu estágio inicial, seguida de várias etapas e culminando com a formação do pigmento escuro (eq. 11.1). A reação de Maillard é a principal causa do escurecimento desenvolvido durante o aquecimento e armazenamento prolongados do produto:

carbonila, que são formados durante a oxidação de lipídios insaturados. No processo oxidativo de ácidos graxos, compostos carbonílicos como *aldeídos*, *peróxidos* e *epóxidos* (Figura 1.1) são formados e interagem com grupos amina dos aminoácidos e das proteínas.

Em situações em que as reações de escurecimento não-enzimático são indesejáveis, estas podem ser inibidas pela utilização de agentes químicos ou criando-se condições adversas, como alterar o teor de água ou pH do meio, reduzir a temperatura e remover uma das substâncias reativas (para o caso do ovo em pó, isto pode ser conseguido pela adição da enzima glicose oxidase (antes da secagem) para degradar a glicose).

De todas as formas utilizadas no controle, o procedimento mais empregado na inibição da reação de Maillard é a aplicação do sulfito, que combina a habilidade de controle destas reações com outras de importância tecnológica (conservante e antioxidante).

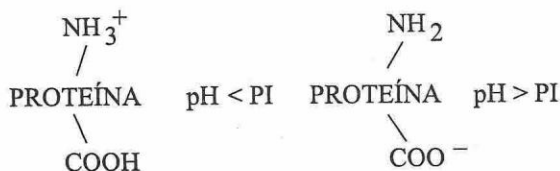
Efeito da temperatura

A reação ocorre em temperatura elevada, bem como em temperatura reduzida, durante o processamento de alimento ou armazenamento. A elevação da temperatura resulta no aumento rápido da velocidade de escurecimento, aumentando de duas a três vezes para cada incremento de 10 °C. A temperatura afeta a composição do pigmento formado, aumentando o teor de carbono, bem como a intensidade do pigmento.

Efeito do pH

A intensidade da reação de Maillard aumenta quase que linearmente na faixa de pH 3 a 8 e atinge a descoloração máxima na faixa alcalina (pH 9 a 10). Para que ocorra a reação entre o açúcar redutor e o grupo amina, é preciso que o par de elétrons do nitrogênio do aminoácido esteja livre, o que ocorre quando o pH é elevado. Contudo, quando se tem o pH baixo, o íon H^+ protona o grupo amina ($-NH_3^+$), não existindo, nesta condição, o par de elétrons livre para reagir com o açúcar redutor (eq. 11.2); conseqüentemente, diminuindo o pH, ocorre também a diminuição da velocidade da reação de Maillard. Porém, em pH muito baixo e presença do ácido ascórbico, ocorre a reação de escurecimento, provocada pela oxidação da vitamina C:

eq. 11.2



Tipos de amina presentes

A reatividade dos aminoácidos envolvidos na reação de Maillard é diferente entre si. A lisina com seu grupo amina epsilon é o mais reativo, pois o grupo amina encontra-se afastado da influência do grupo COOH. Nesta situação, a densidade do par de elétrons é maior no grupo amina livre e, conseqüentemente, maior também é a sua disponibilidade. Obviamente, o pH afeta a velocidade da reação em função do ponto isoeletrico do aminoácido.

Tipos de açúcares presentes

A presença de açúcar redutor é essencial para a interação da carbonila com grupos amina livre. A reação por si só não está confinada a monossacarídeos, mas pode também ocorrer na presença de dissacarídeos redutores (maltose e lactose). A natureza do açúcar na reação determina a reatividade: *pentose* > *hexose* > *dissacarídeo*. Já os dissacarídeos não-redutores somente são utilizados na reação após a hidrólise da ligação glicosídica.

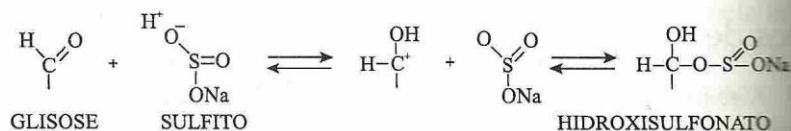
Teor de umidade

A taxa de escurecimento é baixa ou mesmo zero em valores para atividade da água elevada ou muito baixa. Entretanto, aumenta de forma rápida em valores intermediários, dependendo de outras variáveis. O escurecimento é maior em valores intermediários de a_w entre 0,5 e 0,8 (Figura 1.28). Em produtos desidratados, o equilíbrio da reação é deslocado no sentido da formação da glicosilamina (eq. 11.3), favorecendo a formação do pigmento.

Sulfito

O dióxido de enxofre é eficiente no controle da reação de Maillard do escurecimento enzimático e de microrganismos. Atua como inibidor da reação, bloqueando a carbonila e prevenindo a condensação desses compostos pela formação irreversível de sulfonatos e a consequente formação da melanoidina (eq. 11.3):

eq. 11.3

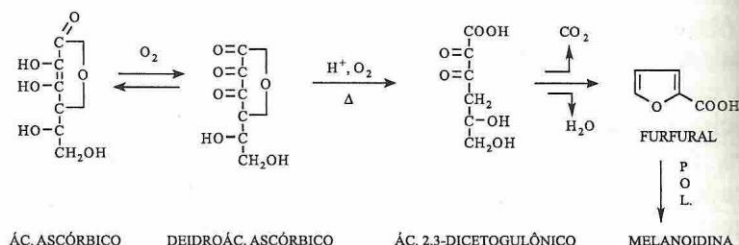


Oxidação da Vitamina C

A vitamina C oxida rapidamente em solução aquosa por processos enzimático e não-enzimático, especialmente quando exposta ao ar, calor e à luz. A reação é acelerada por íons metálicos (Cu^{++} e Fe^{+++}), e em meio de baixa umidade a destruição é função da atividade da água. Na ausência de catalisadores, o ácido ascórbico reage lentamente com o oxigênio.

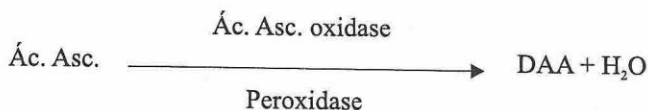
A contaminação com íons metálicos (ferro e cobre) durante o processamento resulta no aumento da oxidação do ácido ascórbico para deidroácido ascórbico. O deidroácido ascórbico é convertido (hidrólise) irreversivelmente em ácido dicetogulônico (eq. 11.4) e posteriormente, pela desidratação seguida da descarboxilação, ocorre a formação do furfural. A reação de polimerização subsequente forma pigmentos escuros. A conversão do ác. ascórbico para dicetogulônico é a rota normal para a destruição da vitamina C em alimentos. Tal como outros compostos dicarbonílicos o dicetogulônico reage com aminas formando pigmentos escuros.

eq. 11.4



Certas enzimas (*peroxidase* e *ácido ascórbico oxidase*) presentes no alimento aceleram a oxidação do ácido ascórbico. Essas enzimas devem ser inativadas para prevenir as perdas oxidativas do ácido ascórbico (eq. 11.5):

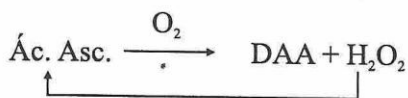
eq. 11.5



A oxidação indireta do ácido ascórbico ocorre pela ação das quinonas oriundas da oxidação de compostos fenólicos pelas PPOs. A velocidade da oxidação aeróbica é dependente do pH; é mais rápida e a degradação é maior em meio alcalino. Em pH muito ácido, o íon hidrogênio catalisa a decomposição do ácido ascórbico pela hidrólise do anel da lactona e, com a adicional descarboxilação e desidratação, ocorre a formação do furfural e de ácidos.

A oxidação aeróbica do ácido ascórbico produz, além do deidroácido ascórbico (DAA), a água oxigenada (eq. 11.6), resultando em adicional destruição da vitamina C:

eq. 11.6



Em frutas e vegetais desidratados, o escurecimento ocorre com a interação do DAA com aminoácidos e, ou, proteínas através de reações envolvendo aminoácidos, de duas maneiras: pela formação do deidroácido ascórbico, o qual reage com aminoácidos, formando compostos coloridos; ou, alternativamente, pela conversão para 2-aldeidofurano, o qual se escurece rapidamente, principalmente na presença de aminoácidos (Figura 11.1):

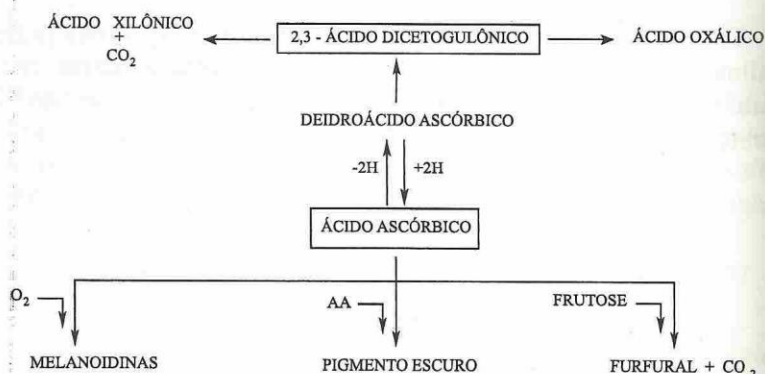
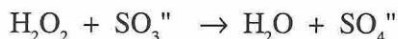
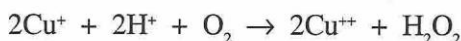
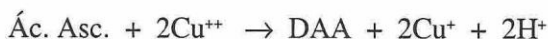


Figura 11.1 - Produtos de degradação do ácido ascórbico.

As perdas mais significativas no processamento de alimento são o resultado da degradação química. Em alimentos ricos em ácido ascórbico, a perda está associada com as reações de escurecimento não-enzimático. No processamento de frutas, a utilização de SO_2 reduz as perdas de ácido ascórbico durante o processamento e armazenamento.

O sulfito adicionado reduz o peróxido de hidrogênio formado pela oxidação do ácido ascórbico na presença de Cu^{++} , protegendo indiretamente, desta maneira, o ácido ascórbico da oxidação (eq. 11.7):

eq. 11.7



Com a adição do SO_2 , o deidroácido ascórbico (DAA) forma produto de adição (DAA-SO_2), prevenindo sua participação nas reações de escurecimento não-enzimático. Outra forma de ação do sulfito no controle do escurecimento se verifica na interrupção das reações de formação de compostos carbonílicos.

O armazenamento de sucos concentrados por longos períodos de tempo requer condições de congelamento, para evitar as reações de

escurecimento não-enzimático. O suco concentrado de laranja contendo elevados níveis de ácido ascórbico escurece mais rapidamente que o suco de maçã, de pêra e de uva, em razão dos baixos níveis de ácido ascórbico.

A concentração de ácido ascórbico em frutas e vegetais varia com as condições de crescimento, maturação e tratamento pós-colheita (Tabela 11.1). Geralmente, o ácido ascórbico em frutas é mais estável que em vegetais em razão de sua maior acidez. A origem do suco de fruta por si só determina a estabilidade do ácido ascórbico. Por exemplo, a estabilidade no suco de laranja é maior que no suco de maçã; no de abacaxi, é maior que no suco de limão; e no suco de laranja, é maior que no suco de limão. A razão, entretanto, não está devidamente esclarecida, mas acredita-se na participação de *flavonóides* atuando na inibição da oxidação enzimática (bloqueando a formação de radicais livres) e da não-enzimática (complexando metais) e, possivelmente, do *ácido cítrico* atuando também na complexação de metais.

Tabela 11.1 - Conteúdo aproximado de ácido ascórbico em frutas e vegetais

Produto	Ác. Ascórbico (mg/100 g)	Ác. ascórbico (mg/100 g)	
<i>Vegetais</i>		<i>Frutas</i>	
Aspargo	15 - 30	Abacate	13 - 37
Batata	10 - 30	Abacaxi	20 - 40
Brócolis	90 - 150	Acerola	1300
Repolho	30 - 60	Caju	200 - 300
Couve-flor	60 - 80	Goiaba	200 - 300
Cenoura	5 - 10	Banana	5 - 10
Cebola	10 - 30	Limão/laranja	50 - 80
Ervilha	10 - 30	Maçã	10 - 30
Pimentão	125 - 200	Manga	10 - 100
Tomate	10 - 30	Maracujá	20 - 30
Espinafre	50 - 90	Melão	10 - 33
		Morango	40 - 90
		Pêssego	7 - 14

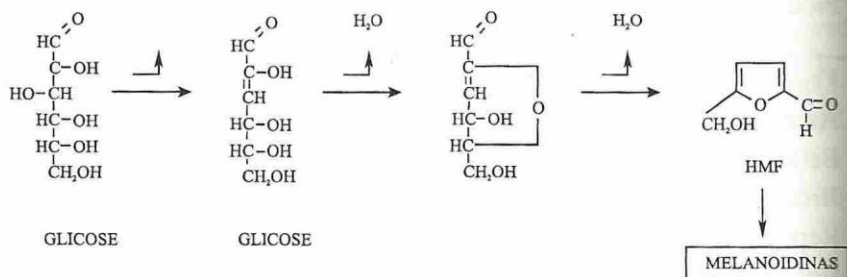
A destruição anaeróbica do ácido ascórbico deve ser também levada em consideração. A velocidade desta reação é independente do pH, exceto na faixa entre 3 e 4, em que há um ligeiro aumento da oxidação. Dentre os aceleradores desta reação estão a frutose, frutose-6-fosfato, frutose-1,6-difosfato, sacarose e frutose caramelizada, sendo o produto final da reação o furfural e o CO_2 (Figura 11.1).

Reação de Caramelização

A reação envolve a degradação do açúcar na ausência de aminoácidos ou proteínas. Os açúcares no estado sólido são relativamente estáveis ao aquecimento moderado, mas em temperatura acima de 120°C são pirolisados para diversos produtos de degradação de alto PM e escuros, denominados caramelo.

A reação se inicia pela desidratação do açúcar redutor com rompimento das ligações glicosídicas, introdução de ligação dupla (eq. 11.8) e formação de intermediários incolores de baixo PM; os polissacarídeos são inicialmente hidrolisados para monossacarídeos.

eq. 11.8



A composição química do pigmento é extremamente complexa e pouco conhecida, muito embora caramelos obtidos de diferentes açúcares sejam similares em composição. A fração de baixo PM presente na mistura caramelizada possui, além do açúcar que não reagiu, ácido pirúvico, aldeídos e derivados do furano.

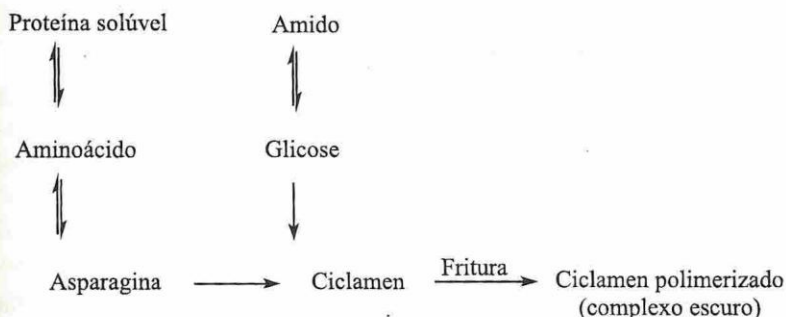
A reação de caramelização é essencialmente iônica, podendo ser catalisada por ácidos (pH:2-4) ou bases (pH:9-10). A velocidade da reação é maior em meio alcalino.

Reações de Escurecimento em Alimentos

Batata

O escurecimento não-enzimático da batata ocorre em razão da interação da glicose com a asparagina formando o ciclamen. Este se polimeriza durante a fritura formando complexo escuro. A asparagina está presente em concentrações elevadas no tubérculo e a glicose é o substrato limitante. Esta se origina da degradação do amido e níveis acima de $0,35 \text{ mg.g}^{-1}$ tubérculo resulta em severo escurecimento (eq. 11.9):

eq. 11.9



Leite e derivados

São muito sensíveis às reações de escurecimento não-enzimático, em razão do elevado teor de lactose e da presença de proteínas termossensíveis, especialmente proteínas do soro. Como consequência negativa, durante o tratamento térmico ocorre a alteração da cor, além da destruição da lisina.

Durante o tratamento industrial do leite e, ou, doméstico, a destruição da lisina varia de acordo com o tempo e processo de aquecimento. Por exemplo, em leite pasteurizado a perda é em torno de 3% e, no esterilizado, de 8 a 12%; dependendo do processo de secagem do leite, pode ocorrer perda de até 30%. A intensidade das reações durante o armazenamento do leite em pó e evaporado depende da temperatura e umidade do produto.

Carne e derivados

São relativamente resistentes às reações de escurecimento não-enzimático, em razão da acidez natural e do baixo teor de açúcares reativos. Em peixes, as reações são mais intensas, pelo fato de possuírem alto teor de ribose ou pelo aumento do pH em razão de alterações verificadas *post mortem*.

Cereais e derivados

As reações durante o processamento de cereais resultam na destruição da lisina, mas, por outro lado, ocorre a formação de *flavor* e de coloração desejáveis, em razão das reações de Maillard e de caramelização. As reações podem ser induzidas pela adição de açúcares redutores ou, naturalmente, pela hidrólise do amido.

Os grãos são estáveis quando intactos, mas com a moagem iniciam-se as reações. Secagem de macarrão, cozimento de pão etc. resultam em alta destruição da lisina, especialmente em temperatura elevada e baixo teor de umidade.

Vegetais e derivados

No processamento de frutas e vegetais, as reações de deterioração resultantes são importantes em produtos concentrados e desidratados, principalmente em vegetais não-ácidos ou com baixa acidez e ricos em açúcares e aminoácidos. O controle do processo de secagem é crítico para a qualidade do produto final, e o escurecimento atinge o máximo na faixa de a_w entre 0,53 e 0,55 (Figura 1.28).

Em produtos esterilizados como frutas enlatadas não ocorre escurecimento significativo, em razão do elevado teor de água e da acidez do meio (pH: 3-4). Nestas condições, as reações de escurecimento não-enzimático não são importantes, exceto se estas contiverem antocianinas (Capítulo 13), como em picles e sucos.

Café

A composição do grão de café verde consiste principalmente de carboidratos, incluído os polissacarídios (glucomanas, celulose), dissacarídios (sacarose) e monossacarídios (glicose, galactose, arabinose, frutose, manose, manitol, xilose e ribose), lipídios (triglicerídios ~75%), esteróis (estigmaesterol, sitosterol), ácidos graxos (linoléico, linolênico,

oléico, palmítico, esteárico, araquídico, lignocérico e behênico), diterpenos (cafestol e kahweol), tocoferol e tocotrienóis, proteínas, aminoácidos livres (asparagina, glutâmico, alanina, aspártico e lisina). Possui diversas espécies de xantinas (cafeína, teobromina e teofilina). Outros componentes incluem os ácidos voláteis alifáticos (fórmico e acético) e ácidos na-voláteis (lático, tartárico, pirúvico, cítrico), trigonelina e ácido nicotínico).

A polpa, subproduto obtido durante o processamento úmido do fruto, corresponde a 29% do grão de café verde. O descarte desta torna-se fonte de poluição, sendo em parte, aproveitado como ingrediente de ração para suíno, aves e gado. Entretanto, fatores antinutricionais da polpa como a cafeína e polifenóis afeta o crescimento e desenvolvimento dos animais quando utilizado acima de 10% na ração.

Os compostos fenólicos participam da formação do *flavor* do café torrado, sendo produzidos pela degradação térmica de *carboidratos*, *ácido clorogênico* e *ligninas*. Aproximadamente, 791 substâncias voláteis (Tabela 11.2) são encontrados no café torrado, sendo ~7% identificados como fenóis. Tanto a temperatura como o tempo utilizado na torrefação influencia na produção e composição de fenóis. O teor de ácido clorogênico diminui com o aumento da temperatura e do tempo durante o processo de torrefação, enquanto o teor de cafeína permanece inalterado. Além da torrefação, a descafeinação também remove quantidades substanciais de ácido clorogênico.

O catecol predomina sobre os demais tipos de fenóis encontrados no aroma do café (Figura 11.2), oriundo da degradação do ácido quínico e caféico.

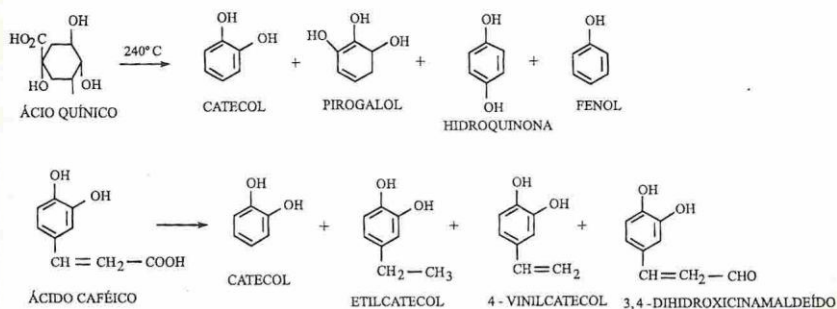


Figura 11.2 - Degradação do ácido quínico e caféico durante a torrefação.

Na torrefação de café, os grãos são submetidos a condições variáveis de temperatura, para se obterem sabor, cor e *flavor* agradáveis. Dependendo da temperatura, do tempo e da luminosidade, um produto final escuro ou mais claro pode ser obtido.

Vários componentes, como açúcares redutores e polissacarídeos, são os precursores da reação. Os açúcares redutores são decompostos rapidamente em temperaturas mais baixas, enquanto os polissacarídeos não-redutores (amido, celulose e outros componentes) são inicialmente hidrolisados com o aquecimento para açúcares redutores e, subsequentemente, transformados em pigmentos escuros. Em temperatura mais amena, a hidrólise para monossacarídeos é mais rápida que sua decomposição e o produto final é mais claro. Em temperatura mais elevada, a degradação do açúcar redutor é mais rápida e o produto final, mais escuro.

O grão verde não possui o aroma típico de café, e somente após o tratamento térmico o sabor característico é então percebido. O sabor do café é devido à cafeína, a ácidos (acético, fórmico, clorogênico e cítrico), a substâncias fenólicas e voláteis formados durante o tratamento térmico do grão. Este processo é caracterizado pela diminuição de substâncias “velhas” e formação de novas. A temperatura utilizada, na faixa de 200 a 250 °C (5-15min), promove diversas alterações: expansão do grão (50 a 80%), alterações na estrutura e coloração. A cor esverdeada torna-se escura com o aparecimento do aroma típico e ocorre perda de 13 a 20% em peso. Quatro fases podem ser distinguidas:

(1) A alteração inicial ocorre em temperatura igual ou acima de 50°C, com o início da desnaturação da proteína e a evaporação de água.

(2) O escurecimento do grão ocorre acima de 100 °C, devido à decomposição térmica e pirólise de compostos orgânicos.

(3) Liberação de produtos voláteis (H_2O , CO_2 e CO) à temperatura de 150 °C, resultando no aumento de volume do grão.

(4) A fase final de decomposição, que se inicia em temperatura entre 180 e 200 °C, é caracterizada pela liberação do aroma típico. Acima de 200 °C ocorrem reações de condensação e polimerização, com a formação de melanoidinas e de compostos aromáticos. O teor de umidade neste ponto situa-se entre 1,5 e 3,5%.

- Composição do café torrado

A composição é muito variável (Tabela 11.2) e depende da variedade e da extensão do tratamento térmico.

Tabela 11.2 - Composição do café torrado (arábica)

Constituintes	Teor (%)
Umidade	2,5
Proteína	9,0
Polissacarídeos, insolúveis em água	24,0
Polissacarídeos, solúveis em água	6,0
Sacarose	0,2
Glicose, frutose, arabinose	0,1
Lipídios	13,0
Ác. clorogênico	3,7
Ácido fórmico	0,1
Ácido acético	0,25
Ác. láctico, pirúvico, oxálico, tartárico, cítrico	0,4
Cafeína	1,2
Trigonelina	0,4
Ácido nicotínico	0,02
Aromas voláteis	0,1
Minerais	4,0
Não identificados	35,0

- Proteínas

O aquecimento da proteína na presença de carboidratos altera substancialmente a sua composição. Os aminoácidos reativos, como arginina, aspártico, cistina, histidina, lisina, serina, treonina e metionina, diminuem no café torrado, representando cerca de 18% de perda. Um número considerável de pirazinas é originado da decomposição de aminoácidos e proteínas.

- Carboidratos

Os carboidratos presentes, como a celulose e outros polissacarídeos (manose, galactose e arabinose) insolúveis, são, em sua maioria, degradados durante o aquecimento para fragmentos menores solúveis. A sacarose presente no grão é decomposta para monossacarídeos. Da pirólise da sacarose e de outros açúcares, são formados os compostos heterocíclicos (furanos, pirroles, pirazinas, tiofenos, tiazoles e oxazoles). Durante o tratamento térmico, os polissacarídeos são caramelizados e os aminoácidos, pirolizados. Os produtos da reação de Maillard são formados em elevada concentração, sendo os principais contribuidores do aroma do café. Os hidrocarbonetos, álcoois e compostos carbonílicos são derivados de carboidratos durante a torrefação.

- Melanoidinas

São compostos de coloração escura presentes na fração solúvel do café torrado ou derivado da reação de Maillard ou da caramelização de carboidratos.

- Lipídios

É essencialmente um óleo vegetal típico, com predominância dos ácidos graxos linoléico e palmítico, contendo alta percentagem de insaponificáveis (~11%), dos quais fazem parte principalmente os diterpenos cafestol e caveol (cap. 18). A fração lipídica é bastante estável e sobrevive ao aquecimento, com pequenas alterações. O café arábica contém maiores quantidades de óleo que o robusta, com teores variando de 10,5 a 17,7% e 8 a 10%, respectivamente. A torrefação praticamente não afeta a quantidade absoluta do óleo, entretanto, a perda da umidade aumenta o seu teor relativo.

- Ácidos

O ácido clorogênico é o mais abundante e, durante o processo de torrefação, 30-70% é decomposto, dentre outros, para ácido quínico. Os compostos fenólicos são os principais entre os aromáticos e são derivados da decomposição térmica do ácido clorogênico. Os ácidos fórmico e acético predominam entre os ácidos voláteis, enquanto os não-voláteis são o lático, tartárico, pirúvico e cítrico.

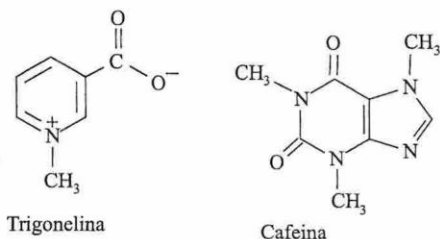
- Taninos

São parcialmente decompostos para substâncias fenólicas voláteis durante a torrefação.

- Cafeína

Possui ligeiro sabor amargo e se decompõe muito pouco durante o aquecimento. A trigonelina (eq. 11.10), diferentemente da cafeína, a qual é termicamente estável, é decomposta para diversas piridinas e pirroles:

eq. 11.10



- Constituintes voláteis

O café torrado é um dos produtos especialmente ricos em aroma. Quase 800 componentes já foram descritos na literatura (Tabela 11.3), sendo a metade constituída de compostos heterocíclicos (furanos, pirrones, lactonas, pirroles, piridinas, pirazinas e tiofenos). Nenhum dos 791 compostos identificados por si só possui o aroma típico. Estes devem estar presentes na mistura em proporções e quantidades corretas, para que se tenha a percepção sensorial total do aroma.

Os fenóis predominam entre os compostos aromáticos, sendo derivados da decomposição térmica do ácido clorogênico e os compostos heterocíclicos são derivados da pirólise da sacarose e outros açúcares.

No processo de torrefação do café, diferentes colorações do grão podem ser obtidas. Mais claro, utiliza-se em temperatura entre 200-220 °C/3 a 10 min, ocorrendo perdas entre 14-17%, e coloração mais escura (expresso) em temperatura de 230 °C, com perdas de até 20%. Em relação ao armazenamento, o café verde pode ser armazenado por até 3 anos, enquanto o torrado e embalado comercialmente (lata, plástico, vidro) por até 10 semanas. Para o grão torrado inteiro e embalado na ausência de oxigênio (embalagem a vácuo) se mantém por até oito meses, mas tão logo seja aberta a vida útil cai para 1-2 semanas.

Tabela 11.3 - Classes de compostos aromáticos em café

Classe química	Número de compostos
Hidrocarbonetos	74
Álcoois	20
Aldeídos	30
Cetonas	73
Ácidos	25
Ésteres	31
Lactonas	3
Fenóis	48
Furanos	127
Tiofenos	26
Pirroles	71
Oxazoles	35
Tiazoles	27
Piridinas	19
Pirazinas	86
Aminas e compostos nitrogenados	32
Compostos sulfurosos	47
Outros	17
	791

Tiofeno



Tiazole



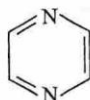
Furano



Piridina



Pirazina



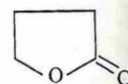
Oxazole



Pirrole



Lactona



Em armazenamento na presença de ar, o sabor do café se deteriora de forma rápida, provavelmente devido à oxidação de furanos, lipídios (formação de radicais livres durante a torrefação) e derivados sulfurosos; porém, em condições de estocagem a vácuo, a qualidade é preservada durante meses. O sabor ácido é proveniente de diversos ácidos orgânicos, em particular os fenóis ácidos (7,5% de "peso seco"), incluindo os ácidos ferrúlico, caféico e, principalmente, clorogênico.

O sabor do café depende também do pH da bebida. Utilizando-se 42,5g/l de café torrado à temperatura mais baixa (~200 °C), o pH deve ser entre 4,9 e 5,2. Com pH abaixo de 4,9, o café possui sabor ácido e, acima de 5,2, amargo. Geralmente, o pH da variedade robusta é mais alto que o da variedade arábica. Dependendo do processo de obtenção da bebida (tamanho da partícula, tipo regular – 50g/l – e expresso – 150g/l –, temperatura da água etc.), 18-35% do café torrado é solubilizado, e o teor de matéria seca varia de 1 a 3%. A composição é apresentada na Tabela 11.4.

Tabela 11.4 - Composição da bebida (arábica, 50g/l)

Constituinte	Teor (% "peso seco")
Proteína	6
Polissacarídios	24
Sacarose	0,8
Monossacarídios	0,4
Lipídios	0,8
Ácidos voláteis	1,4
Ácidos não-voláteis	1,6
Ácido clorogênico	14,8
Cafeína	4,8
Trigonelina	1,6
Compostos voláteis (aroma)	0,4
Minerais	14
Não identificados (pigmentos, const. amargo etc.)	29,4

Escurecimento Não-Enzimático: Reação e Controle

Reagentes

- Solução de monoglutamato de sódio 30,0%.
- Bissulfito de sódio.
- Hidróxido de sódio 2,0 N.
- Soluções de glucose, sacarose e frutose (25,0%).

Procedimento

Parte A

- Preparar 12 tubos de ensaio com rosca contendo 2,0 ml da solução de monoglutamato de sódio + 5,0 ml de água + 2,0 ml de glucose.
- Tomar quatro tubos e adicionar 0,05 g de NaHSO_3 ; aquecer em banho-maria por 0, 15, 30 e 60 minutos.
- Tomar quatro tubos e adicionar 0,5 ml de NaOH 2 N; aquecer em banho-maria por 0, 15, 30 e 60 minutos.
- Submeter os quatro tubos restantes a aquecimento.

Parte B

Preparar 12 tubos de ensaio com rosca contendo 2,0 ml de monoglutamato de sódio + 2,0 ml de sacarose + 5,0 ml de água e prosseguir como na parte A.

Parte C

Preparar 12 tubos de ensaio com rosca contendo 2,0 ml de monoglutamato de sódio + 2,0 ml de frutose + 5,0 ml de água e prosseguir como na parte B.

Parte D

Fazer a leitura a 340 nm, no Spectronic 20, reproduzir graficamente os resultados obtidos (absorvância x tempo de aquecimento) e explicar os resultados.

EXERCÍCIOS

1 - Os seguintes resultados foram obtidos após leitura no Spectronic-20; reproduzir graficamente e explicar os resultados:

Tubo/Aquec.(min)	%T (340 nm)		
	GLU+MSG	FRU+MSG	SAC+MSG
1 / 0	94	94	94
2 / 15	91	40	92
3 / 30	43	18	92
4 / 60	14	8	86

2 - Foram preparados 12 tubos contendo a seguinte solução: 2,0 ml MSG + 2,0 ml de glicose; após os tratamentos abaixo especificados, aqueceram-se os tubos em banho-maria durante 0, 15, 30 e 60 minutos.

- *Tratamento 1*: em quatro tubos foi adicionado 0,05 g de NaHSO_3 .

- *Tratamento 2*: em quatro tubos foi adicionado 0,5 ml de NaOH 2N.

- *Tratamento 3*: os tubos restantes (controle) foram aquecidos.

Os resultados obtidos após a leitura no Spectronic-20 ($A_{340 \text{ nm}}$) encontram-se discriminados a seguir; reproduzir graficamente e explicar cada tratamento:

Tratamento	Absorvância (340 nm)			
	0	15	30	60 (min)
NaOH	0,06	1,2	1,5	1,7
NaHSO_3	0,06	0,06	0,10	0,30
Controle	0,0	0,10	0,50	1,0

ENZIMAS: CATALASE E PEROXIDASE

Introdução

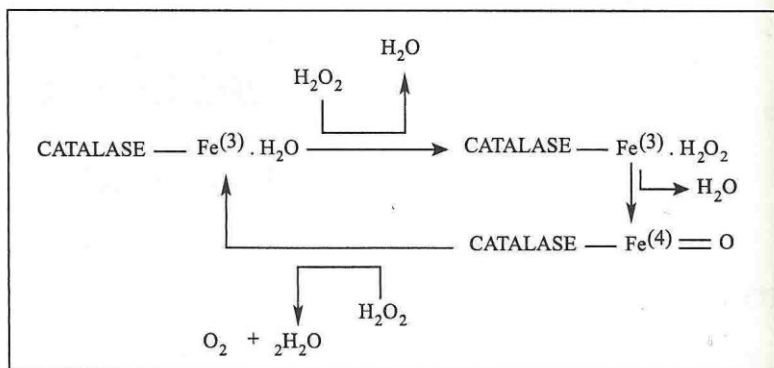
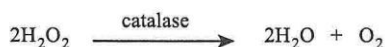
Frutas e vegetais armazenados, mesmo à temperatura de congelamento, podem-se deteriorar em razão da presença de certas enzimas. Conseqüentemente, os vegetais e algumas frutas, para serem preservados por enlatamento, congelamento ou desidratação, são, em sua maioria, branqueados para inativar as enzimas.

As enzimas catalase e peroxidase ocorrem em plantas, animais e microrganismos e são utilizadas para testar a eficiência do branqueamento de frutas e vegetais antes de seu congelamento e armazenamento. Ambas possuem o grupo prostético ferriprotoporfirina (Fe^{+++}): *um grupo prostético em peroxidase e quatro em catalase*, os quais influenciam as reações químicas catalisadas por estas enzimas.

Atividade Enzimática

Acredita-se que a função da catalase e das peroxidases, bem como da superóxido dismutase, é proteger os tecidos animal e vegetal contra os efeitos tóxicos da H_2O_2 formada durante o metabolismo celular. A remoção da H_2O_2 (eq. 12.1), em nível celular, evita a formação do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) pela reação com o $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Capítulo 3). A lactoperoxidase em leite tem ação antibacteriana.

eq. 12.1

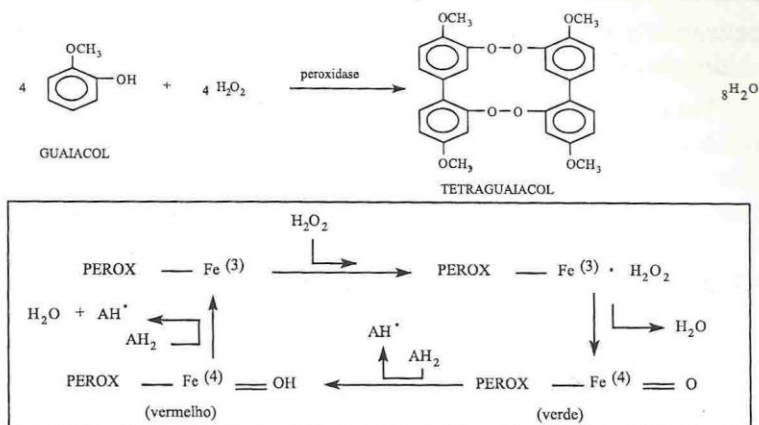


Essa enzima é importante, dos pontos de vista nutricional, de coloração e *flavor*. Por exemplo, a atividade da peroxidase pode levar à destruição da vitamina C e descoloração de carotenóides e antocianinas, além de catalisar (grupo heme) a degradação não-enzimática de ácidos graxos insaturados, com a conseqüente formação de compostos voláteis (sabor oxidado).

A atividade da peroxidase está associada ao aparecimento de sabores estranhos em alimentos termicamente processados de maneira inadequada, sem que ocorra a inativação da enzima.

É capaz de oxidar compostos fenólicos somente na presença de H_2O_2 (eq. 12.2). Sua detecção é baseada no desenvolvimento da cor na presença do substrato: *guaiacol-água oxigenada*. O complexo peroxidase-peróxido formado oxida o guaiacol (incolor), transformando-o em um produto final colorido.

eq. 12.2



A (doador de hidrogênio): GUAIACOL, PIROGALOL, TIROSINA, FLAVONÓIDES

Controle

A peroxidase é considerada uma das enzimas mais termorresistentes, de forma que, quando inativada, certamente as demais enzimas e os microrganismos patogênicos serão destruídos. Na maioria dos casos, o branqueamento entre 90-100 °C/3,0 min é o suficiente para destruí-la.

No processamento de frutas e vegetais, a peroxidase é a principal responsável pela formação de *flavor* estranho durante o armazenamento de produtos enlatados, principalmente em vegetais não-ácidos. Sua atividade diminui em pH baixo e pH elevado. A perda da atividade observada com acidificação é atribuída a mudanças do estado nativo para a condição desnaturada, ocasionada pela liberação do grupo heme da proteína. Portanto, a alteração da atividade com o pH está relacionada com a mudança estrutural na molécula da enzima. A regeneração da enzima após o tratamento térmico é dependente do pH, e valores entre 5,0 e 8,0 recuperam sua atividade, enquanto em pH abaixo de 5,0 ocorre adicional perda. O pH ótimo para atividade da peroxidase varia com a fonte, oscilando de 3,0 a 7,0.

O inibidor químico mais frequentemente utilizado no controle da peroxidase na indústria é o dióxido de carbono ou sulfitos. A utilização de 0,1 a 0,15% de metabissulfito de sódio previne a formação de *flavor* estranho durante o armazenamento de vegetais processados. A ação do

sulfito se verifica na destruição da H_2O_2 ($SO_2 + H_2O_2 \rightarrow SO_3'' + H_2O$), bloqueando a atividade da enzima, pela manutenção do substrato (doador de hidrogênio) na sua forma reduzida.

Para o enlatamento e congelamento de vegetais, é importante que o procedimento de branqueamento seja adequado, evitando o desenvolvimento de sabores e odores estranhos no produto processado durante o seu armazenamento. Diversas enzimas, como a catalase, peroxidase, polifenoloxidase e lipoxigenase, devem ser inativadas pelo branqueamento para se garantir produto congelado estável.

Método simples, mas não quantitativo, para verificar a adequação do branqueamento é a adição de uma gota de solução 0,5 a 3,0% de peróxido de hidrogênio na superfície cortada do vegetal branqueado. O aparecimento da coloração rósea indica a presença da peroxidase, enquanto o aparecimento de bolhas indicam presença de oxidase.

A diminuição da atividade da peroxidase é considerada o melhor indicador de qualidade em vegetais congelados. Entretanto, a enzima desnaturada tende a regenerar sua atividade durante o armazenamento. A estabilidade ao calor e distribuição das várias peroxidase isoenzimas nos tecidos não é necessariamente uniforme. Finalmente, em torno de 1 a 10% da atividade da peroxidase associada ao tecido vegetal não é sensível ao calor. Grandes variações existem em termos de atividade da enzima em vegetais (Tabela 12.1), sendo a mais alta encontrada em repolho (562 U/Kg) e a menor em cebola (8 U/kg).

Tabela 12.1- Atividade da peroxidase em vegetais

Vegetal	Atividade da peroxidase (Unidades/kg)
Repolho	562
Vagem	515
Abóbora	361
Espinafre	195
Aipo	41
Batata	40
Alho-porro	37
Cenoura	12
Cebola	8

Catalase e Peroxidase: Atividade e Controle

Reagentes

- Água oxigenada 0,3%.
- Guaiacol 0,5%.

Procedimento

A - Teste para Catalase

- Transferir, para dois tubos de ensaio, 5,0 ml do filtrado de maçã.
- Aquecer um dos tubos em água quente/5,0 min.
- Adicionar 5,0 gotas de água oxigenada em cada tubo.
- Inverter os tubos, mas não agitar.
- Deixar em repouso por alguns minutos, observar e explicar as reações.

B - Teste para Peroxidase

Parte A

- Tomar metade de uma maçã descascada e homogeneizar em liquidificador com 250,0 ml de água fria.
- Transferir 2,0 ml do filtrado de maçã para o tubo de ensaio contendo 20,0 ml de água.
- Adicionar 1,0 ml da solução de guaiacol 0,5% (doador de hidrogênio) e 5,0 gotas de água oxigenada 0,3%; agitar.
- Preparar o branco contendo todos os ingredientes simultaneamente, exceto H_2O_2 .
- Observar mudança na coloração no período de 3,0 min.
- Descrever a reação química.

Parte B

- Pesar cinco amostras de vagem (5,0 g cada) e aquecer, em água fervente, durante 1, 2, 3, 4, 6 e 8 min (controle no tempo zero).
- Resfriar rapidamente em água gelada (2,0 min).

- Amassar cada amostra em mortar + 30,0 ml de água fria.
- Transferir para o béquer devidamente identificado e adicionar 1,0 ml de guaiacol 0,5% + 0,5 ml de H_2O_2 .
- Agitar, deixar em repouso durante 3,0 min e filtrar.
- Fazer leitura em Spectronic 20 a 420 nm.
- Reproduzir graficamente (absorvância x tempo de aquecimento) os resultados obtidos e observar o tempo de aquecimento para inativação da enzima.

EXERCÍCIOS

1 - Os seguintes dados foram obtidos em experimento para inativação da peroxidase em vegetal (Spectronic 20 a 420 nm).

Branqueamento	% T
1 min	0
2 min	3,0
3 min	14,5
4 min	23,0
6 min	27,0

- Reproduzir graficamente os dados acima e determinar o tempo necessário para inativar a peroxidase.

- Qual o pigmento responsável pela absorção e como é formado?
- Por que ocorre a diminuição da absorvância com aquecimento?

2 - A determinação da atividade da peroxidase em cenoura e nabo foi obtida conforme os dados a seguir:

- amostra = 40 g (85% de umidade) + 400 ml de água homogeneizada em liquidificador e filtrada; e

- alíquota = 0,3 ml.

A - Cenoura

S/Branqueamento		1 min Branq.	4 min Branq.
Tempo (s)	% T	% T	% T
0	100	100	100
30	76	100	80
60	75	70	80
90	74	70	"
120	72	76	"
150	71	76	"
180	70	76	"
210	69	76	"
240	68	76	"
270	66	76	"
300	65	76	"

B - Nabo

S/Branqueamento(1:10)		1 min Branq.(1:5)	4 min Branq.
Tempo (s)	%T	% T	% T
0	100	100	100
15	90	89	94
30	68	72	94
45	58	57	94
60	46	44	"
75	38	36	"
90	31	29	"
105	26	24	"
120	22	20	"
135	18	17	"
150	16	"	"

1 - Determinar a atividade da peroxidase nos extratos branqueados e não-branqueados ($\Delta A/\text{min}/\text{grama}$).

2 - Reproduzir os dados graficamente (atividade da peroxidase a 420 nm e a diferentes tempos de aquecimento).

3 - Discutir os resultados.

CORANTES NATURAIS

Introdução

A cor, possivelmente mais que qualquer outro fator, influencia significativamente a aceitabilidade do produto. Geralmente, afeta o julgamento, sendo utilizada como forte indicador de qualidade; portanto, o desenvolvimento de produtos de aparência atrativa é importante para a indústria de alimentos.

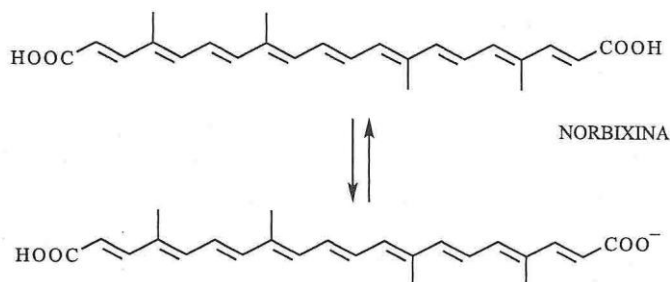
A utilização dos corantes naturais requer o conhecimento químico de suas moléculas para adaptá-las às condições de uso em processos, embalagens e distribuição. Atualmente, permite-se o uso de sete corantes artificiais (Apêndice 8), por diversas razões técnicas: *estabilidade, pureza, disponibilidade e superioridade tecnológica com relação aos corantes naturais*. Sua utilização é limitada por diversos fatores: imposições legais, publicidade adversa e interesse do consumidor por produtos naturais.

Recentemente, os corantes artificiais têm sido questionados por certos segmentos da população, e essa tendência, aliada à publicidade contínua e adversa, tem aumentado o interesse pelos corantes de origem natural. Não se pode culpar o público por ainda acreditar que os aditivos naturais são melhores que os artificiais. Os consumidores são inundados com mensagens nos rótulos, como “contém somente ingredientes naturais” e “isento de aditivos artificiais”. Questiona-se sua utilização com argumentos de que não são necessários e na crença de que os produtos naturais são inerentemente inócuos e melhores que os artificiais.

Na prática, alguns corantes naturais, além das dificuldades tecnológicas de utilização, são problemáticos devido à falta de

De forma alternativa, o pigmento pode ser extraído com solventes adequados, como acetona e metanol, e, após sua remoção, a forma em pó é preparada e, posteriormente, ressuspensa em óleo, em concentrações variando de 3,5 a 5,2% de bixina. A forma solúvel em água é obtida pela abrasão do pericarpo em solução alcalina a 70 °C (saponificação), e o produto resultante é o sal de norbixina (cis e trans), de coloração alaranjada (eq. 13.1).

eq. 13.1



A grande maioria dos alimentos possui pH ácido, de forma que quando se aplica a solução de norbixina o pigmento é disperso e insolubilizado no produto graças ao abaixamento do pH, evitando-se a perda da cor por lixiviação, o que permite coloração uniforme. Sua aplicação é baseada na diferença de solubilidade entre a bixina e a norbixina, sendo a primeira completamente solúvel em óleos e gorduras até 0,1% p/p, enquanto a norbixina é solúvel em água, na forma de sais de sódio ou potássio.

Com a aplicação da bixina em emulsão tipo água/óleo, a cor migra para a fase oleosa. Para obtenção equitativa da coloração na emulsão A/O, faz-se o ajustamento do conteúdo da bixina/norbixina. De modo geral, a estabilidade do urucum é boa. Bixina é sensível ao pH, alterando sua coloração do amarelo-alaranjado para o rosa-fraco, em pH baixo. A estabilidade térmica é considerada boa em temperaturas abaixo de 100 °C.

A utilização do ácido ascórbico e de outros antioxidantes ajuda na estabilização; a exposição ao ar não constitui problema. A estabilidade à luz pode ser problemática, como ocorre com os carotenóides de forma geral. Na ausência da luz, a bixina é estável. A norbixina, em presença de íons de cálcio, precipita. Reage com proteínas, alterando ligeiramente sua coloração para vermelho-apessegado. Esse fato é observado em queijos

coloridos com urucum. Esta propriedade (ligação com proteínas) é importante na coloração de produtos, pois evita a migração da cor para o meio. O urucum é resistente ao crescimento microbiológico e disponível em diversas formas, dependendo do método de extração utilizado:

- com óleo vegetal;
- com solventes orgânicos (metanol, acetona, álcool isopropílico etc.); e
- com solução aquosa alcalina e várias proporções de propileno glicol e etanol. O produto obtido pode ser:
 - 1 - solúvel em óleo (oleoresina);
 - 2 - dispersível em óleo;
 - 3 - solúvel em água (pó); e
 - 4 - solúvel em emulsão óleo/água e água/óleo.

A tonalidade da cor obtida pode variar, dependendo da área cultivada e das condições climáticas, assim como das condições de extração e, ou, de armazenamento. O urucum é utilizado em derivados de leite e em margarina, doces, gorduras, produtos de panificação, cereais, bebidas, sorvetes, cosméticos etc.

Açafrão

Extrato amarelo-ouro extraído de rizomas de *Curcuma long L.* com os solventes acetona, metanol, etanol, éter de petróleo e diclorometano, os quais são removidos posteriormente. O rizoma contém de 2,5 a 8,1% do principal componente cromóforo, denominado curcumina (Figura 13.2). A presença de ligações duplas conjugadas confere sensibilidade ao oxigênio, especialmente quando exposto à luz.

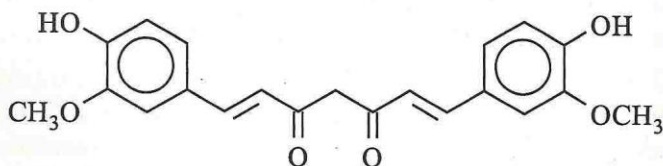


Figura 13.2 - Estrutura da curcumina.

A oleorresina de boa qualidade é praticamente isenta de outros corantes, os quais estão presentes no extrato bruto. Curcumina é insolúvel em água e solúvel em óleos e gorduras. Em razão de sua alta intensidade de cor, pequenas quantidades são suficientes para colorir o produto.

A oleorresina de açafrão pode ser utilizada em sistema aquoso quando associada a emulsificantes, como *propileno glicol* e, ou, *polissorbato 80*, (cap. 4), ou pode ser simplesmente dissolvida em álcool e adicionada ao produto. Quando adicionada a óleos vegetais, a tonalidade final é amarelo-esverdeada. A forma solúvel em água confere coloração variando de amarelo-esverdeado a ouro-pardo. A tonalidade de cor obtida é dependente da concentração, mas é também afetada pelo nível de pureza. A principal limitação deste corante é a sua baixa estabilidade à luz. Esta oleorresina possui boa estabilidade térmica e não é afetada pelo pH até que se atinja a alcalinidade.

A curcumina forma complexos estáveis com proteínas, e esta propriedade é utilizada na produção de misturas complexas de cores naturais. É resistente à oxidação e acredita-se possuir propriedades antioxidantes equivalentes às do BHA/BHT. O produto comercial pode ser obtido na forma de oleorresina e de pó, bem como nas formas solúveis e dispersas em água. É utilizada em bebidas enlatadas, produtos de panificação, derivados de leite, gomas de mascar, cereais, molhos, produtos farmacêuticos e cosméticos. Em combinação com o urucum, é muito empregada no fabrico de queijo, margarina e molhos.

Extrato de Beterraba

O concentrado de beterraba, de coloração vermelha, é obtido do suco da *Beta vulgaris ruba*, por prensagem ou extração aquosa e posterior purificação. O produto é constituído de vários pigmentos, pertencentes à classe das *betalaínas*. Seu principal cromóforo (75 a 95%) no suco é a *betanina*. O produto concentrado é solúvel em água e insolúvel em óleo.

A estabilidade das betalaínas durante o processamento de alimento é influenciada por diversos fatores, e os mais significantes são: temperatura, pH, atividade da água, íons metálicos, oxigênio e luz. Em solução, a tonalidade da cor obtida é dependente do pH, pois entre 4,0 e 7,0 apresenta coloração vermelho-brilhante. Em pH mais baixo, a coloração torna-se vermelha mais escura e, em pH mais elevado,

vermelho-violeta. Melhor aplicação é verificada em produtos com pH entre 4,0 e 7,0 e armazenados por curtos períodos.

O concentrado é sensível ao processamento térmico, mesmo em pH ótimo, ocorrendo a isomerização para *isobetanina*; em meio alcalino, é hidrolisado para *ciclodopa-5-o-glicosídeo* e *ácido betâmico* (Figura 13.3). Portanto, tempo de aquecimento prolongado ou temperatura elevada devem ser evitados.

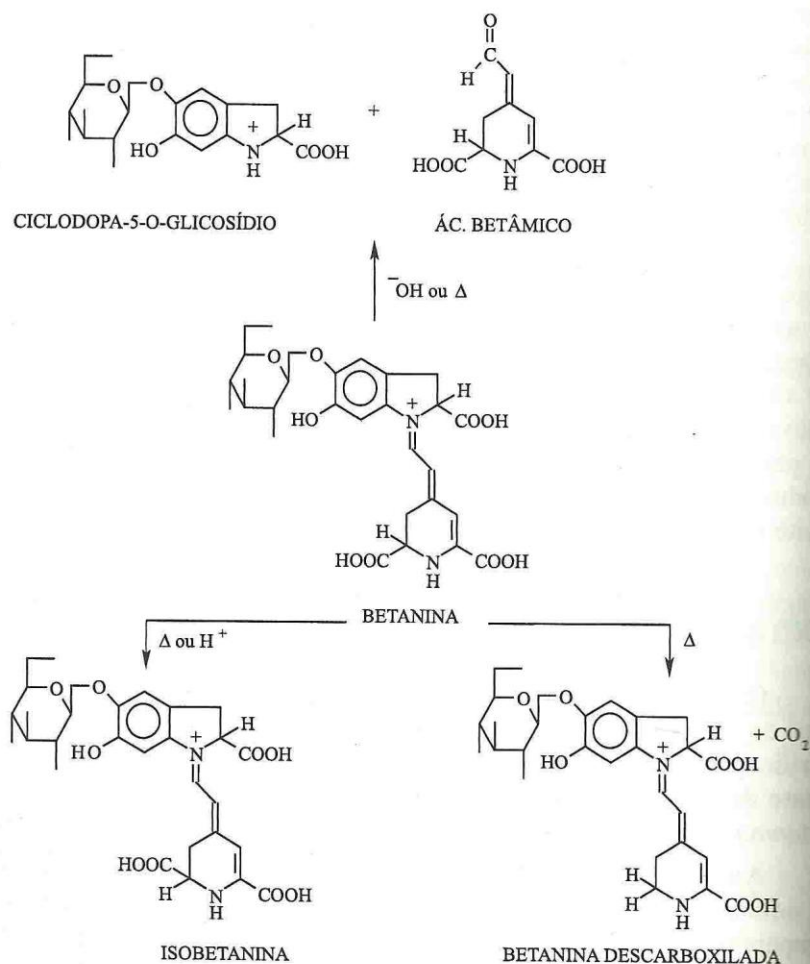


Figura 13.3 - Betanina: reação de produtos de decomposição.

A adição de cor após o tratamento térmico é, às vezes, recomendada, mas se faz necessário verificar inicialmente a carga bacteriana presente no concentrado, a qual é, geralmente, elevada. A estabilidade é também afetada pelo oxigênio e pela luz. Aumento da vida útil pode ser obtido pela adição de ácidos cítrico e ascórbico (0,003-0,2%), que provavelmente atuam como complexantes (metais) e antioxidantes, respectivamente. Sua estabilidade é inversamente proporcional à atividade de água (a_w) do produto, ou seja: diminuição da atividade de água diminui a velocidade de degradação da betanina (reações hidrolíticas).

Este extrato é utilizado em sorvetes, iogurtes, balas, molho, cosméticos, goma de mascar e derivados de leite, podendo ser obtido nas formas de xarope ou pó (*spray-dried* junto com maltodextrina). O teor de betanina é geralmente padronizado em 0,2% para a forma líquida e 0,25% para a forma em pó. A oxidação das betalainas é acelerada na presença da luz, e a adição de ácido ascórbico melhora sua estabilidade. Como o cobre e ferro (cátions) catalisam a oxidação do ácido ascórbico pelo oxigênio molecular, a adição do ácido cítrico aumenta a eficiência do ácido ascórbico na estabilização das betalainas.

Pimentão-Vermelho

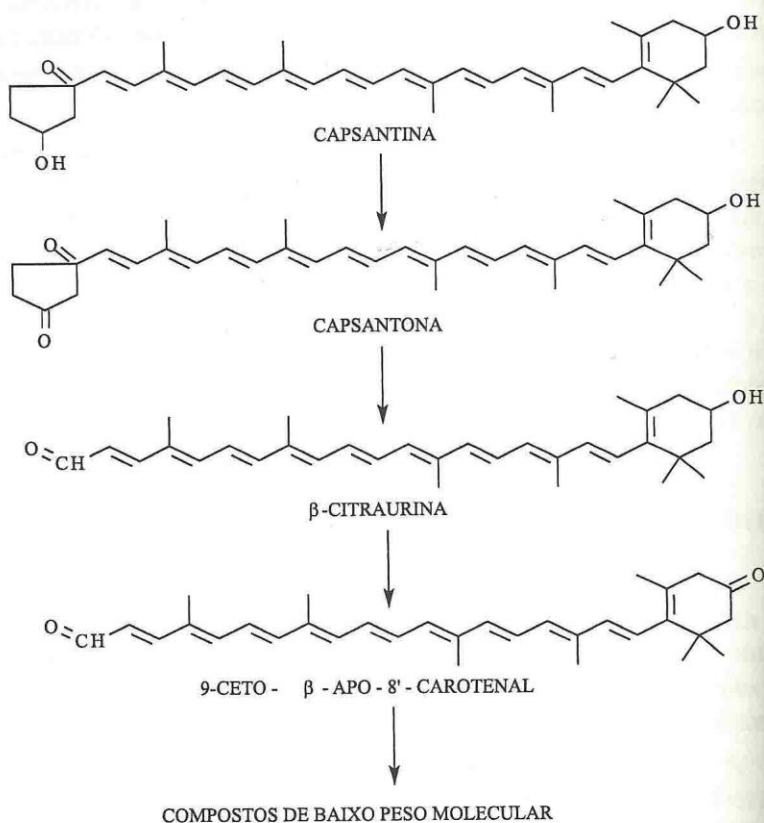
Obtém-se do *Capsicum annum* um corante vermelho-alaranjado, pela extração com solventes, utilizado em carnes e derivados e molhos. O corante é uma mistura complexa, contendo em torno de 50 diferentes pigmentos. Seus principais cromóforos são *capsantina* e *capsorubina* (pigmentos vermelhos) e betacaroteno (pigmento amarelo).

A capsantina representa 40 a 45% dos carotenóides no extrato. A oleorresina é insolúvel em água e solúvel em óleo vegetal e, em mistura com polissorbato-80, torna-se dispersível em água. A coloração típica de alaranjado-vermelho para vermelho-alaranjado depende da concentração, do método de obtenção, do tempo de colheita, das condições de armazenamento etc. A principal variável da coloração final é a inclusão de sementes ou sua remoção antes da extração.

O corante do pimentão, como todos os carotenóides, é sensível ao oxigênio e à luz. Quando esses fatores são excluídos, os carotenóides em alimentos são estáveis mesmo em temperaturas elevadas. Sua **degradação**

é, entretanto, acelerada por radicais livres formados durante a oxidação de lipídios. A degradação oxidativa da capsantina (eq. 13.2) altera a cor de vermelho para castanho. Mudanças na coloração, frequentemente observadas em tomate e pimentão desidratados, estão relacionadas com a degradação oxidativa dos carotenóides.

eq. 13.2



Exposição à luz solar destrói 95% da coloração em três meses, e a adição do ácido ascórbico melhora sua estabilidade. Mesmo no escuro, parte da coloração é perdida quando o corante é armazenado em temperatura elevada. Provavelmente, a perda da cor deve-se à degradação oxidativa, podendo ser retardada pela adição de antioxidantes ou tomando-se cuidado especial na seleção do óleo a utilizar na diluição.

oleorresina. Embalagens adequadas e armazenamento a frio e livre da ação direta da luz aumentam a vida útil do corante.

Cochonila/Carmim

Cochonila é um corante vermelho extraído do corpo de inseto seco (*Dactylopius coccus costa* ou *Coccus cati*). Estes insetos desenvolvem-se em tipos específicos de cactos encontrados no Brasil, Peru e México. Seu cromóforo principal é o ácido carmínico (Figura 13.4), sendo o extrato aquoso conhecido como cochonila. O corante é muito sensível à degradação microbiológica. É geralmente *spray-dried* com maltodextrina.

O ajustamento da proporção do ácido carmínico e dos sais de alumínio altera a coloração final de vermelho-alaranjado para vermelho-escuro – conhecido como carmim –, insolúvel em água e óleo. O carmim possui boa estabilidade à luz e temperatura e em atividade de água elevada, mas descolore na presença de dióxido de enxofre. É solúvel em soluções alcalinas, apresenta coloração violeta, é sensível ao pH e precipita em pH ácido; o precipitado pode ser ressuspenso em água ou gordura.

Em face de sua alta estabilidade, o carmim deveria ser o corante vermelho preferido; contudo, em razão de seu alto custo e suprimento limitado, sua utilização nem sempre é viável. Comercialmente, é disponível em concentrações variando de 50 a 52%. O carmim solubilizado é utilizado em panificação e no fabrico de sobremesas, produtos à base de leite, xarope de frutas e cosméticos.

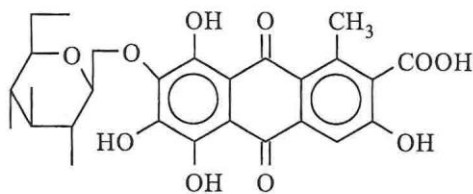
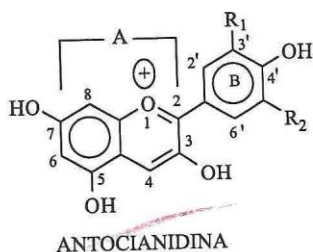


Figura 13.4 - Estrutura do ácido carmínico.

Extrato da Casca de Uva

Extraído com água ou soluções alcoólicas da casca de uva vermelho-escura, este extrato, dependendo da variedade, contém até 25 pigmentos diferentes. O corante é freqüentemente denominado *enocianina*, e seu principal cromóforo presente na casca de uva é a mistura complexa de antocianinas: *antocianidina* (aglicona), *açúcar* e *freqüentemente ácidos* (Figura 13.5). Na natureza, as antocianinas sempre ocorrem na forma heteroglicosídica, contendo uma ou mais moléculas de açúcar e da aglicona antocianidina. São solúveis em água e em mistura de água e álcool, porém insolúveis em óleos e gorduras.



	R ₁	R ₂
CIANIDINA	OH	H
PEONIDINA	OCH ₃	H
DELFINIDINA	OH	OH
PETUNIDINA	OCH ₃	OH
MALVIDINA	OCH ₃	OCH ₃

Figura 13.5 - Estrutura química das principais antocianidinas da uva.

Diferentes monossacarídeos (glicose, galactose, ramanose, arabinose), dissacarídeos e trissacarídeos também podem ser encontrados. Em alguns casos, o açúcar é acilado com os ácidos ferúlico, caféico e p-cumárico (Figura 13.6). A presença do grupo glicosídico na posição 3 confere maior estabilidade, sendo a forma diglicosídica mais estável ao aquecimento e à luz que a monoglicosídica, e a presença do grupo hidroxila na posição 3' aumenta a sensibilidade do composto à degradação.

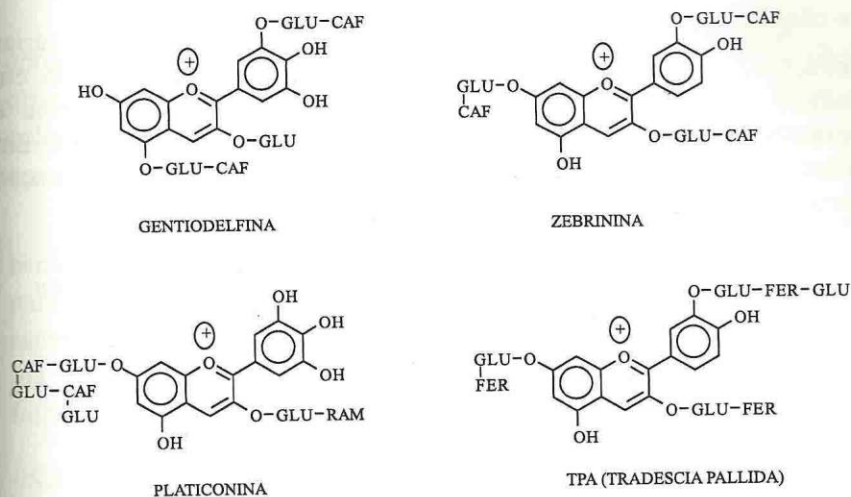


Figura 13.6 - Fórmulas estruturais de algumas antocianinas complexas (Caf. = ác. caféico, Fer. = ác. ferúlico e Ram. = ramanose).

A velocidade de degradação varia grandemente entre as antocianinas, em razão da sua diversidade de estrutura. Geralmente, o aumento da hidroxilação diminui a estabilidade, enquanto o aumento de metilação a eleva. A cor dos alimentos contendo antocianinas ricas em pelargonidina, cianidina ou delfinidina aglicona é menos estável que a dos alimentos contendo antocianinas ricas em petunidina ou malvidina aglicona. O aumento da estabilidade deste último grupo ocorre devido ao fato de os grupos hidroxilados estarem bloqueados.

O núcleo *flavilium* da antocianina é deficiente em elétrons e, portanto, altamente reativo. A sua reação geralmente envolve descoloração do pigmento, sendo, portanto, indesejável no processamento de frutas e vegetais.

Corantes comerciais derivados de uvas têm tido considerável sucesso em bebidas, mas todas as antocianinas convencionais apresentam algum tipo de limitação. Estabilidade é um problema, já que as antocianinas são degradadas na presença de *metais*, *ácido ascórbico*, *açúcar*, *oxigênio*, *luz*, *temperatura* e *enzimas*.

A sensibilidade ao pH (Figura 13.7) é fator limitante em várias situações, afetando a cor e a estabilidade química, descolorindo em valores de pH acima de 4,0. Em soluções ácidas, a antocianina é vermelha, mas com o aumento do pH, a intensidade da cor diminui. Em solução alcalina, a cor azul é obtida, sendo porém instável. Para aplicação geral, o pH entre 1,0 e 3,5 confere maior estabilidade.

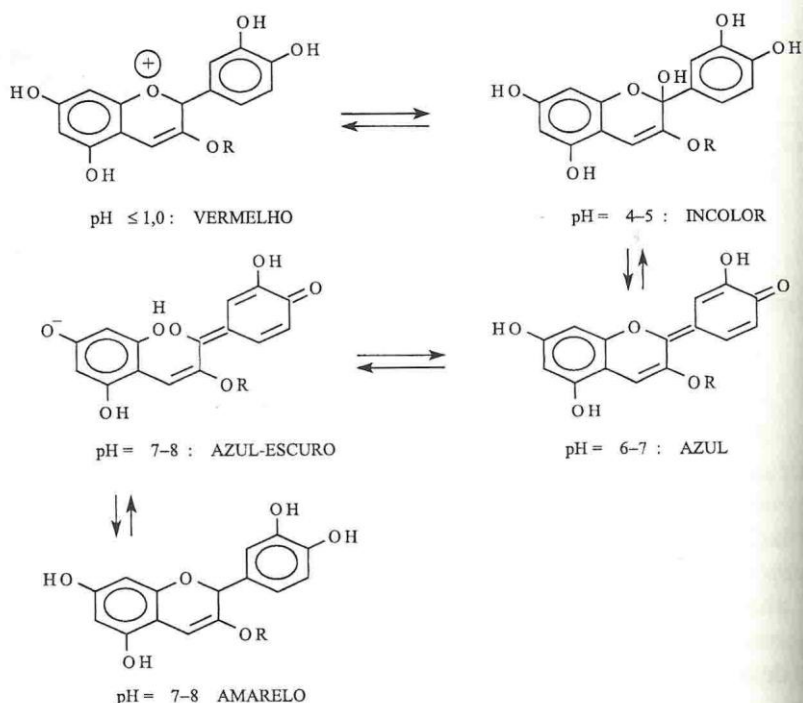


Figura 13.7 - Mudanças de coloração em função do pH.

O pH típico do tecido vegetal varia entre 3,5 e 5,5. As antocianinas retêm a sua coloração original, não a transformando em incolor (como em solução), por se associar em forma de hélice (por meio de atrações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio) com o núcleo *flavilium*, protegendo os grupos cromóforos da reação de hidratação. Outro mecanismo de proteção é a co-pigmentação, provavelmente por intermédio de pontes de hidrogênio dos grupos fenólicos entre a antocianina e as moléculas de flavonas, taninos e polipeptídios.

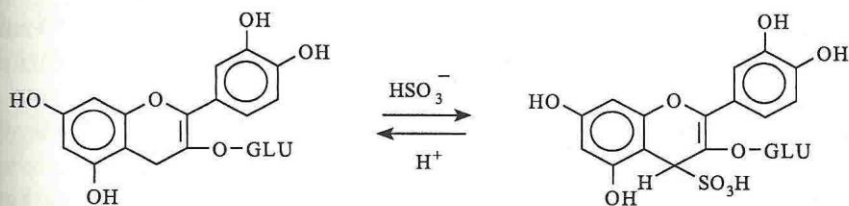
O corante não é estável ao aquecimento prolongado, alterando sua coloração original para castanho-escuro. Entretanto, esse efeito não é observado em condições normais de pasteurização e HTST. Perda da coloração e escurecimento também podem ocorrer durante o armazenamento; portanto, o uso de baixa temperatura é recomendado.

As antocianinas não são afetadas pela luz. São utilizadas em bebidas ácidas, geléias, doces e cosméticos. A adição de ácido ascórbico para efeito de estabilização não é recomendada, e a presença de açúcares, especialmente a frutose, acelera o processo de escurecimento. Além do pH (principal responsável pela estabilidade das antocianinas), outros fatores contribuem para sua degradação, como os descritos a seguir.

- Sulfito

O dióxido de enxofre, utilizado na prevenção do escurecimento e crescimento microbiológico, promove a descoloração da antocianina, por sua adição na posição 2 ou 4 (eq. 13.3). A cor, entretanto, pode ser regenerada por acidificação e aquecimento do produto para remover o dióxido de enxofre. Entretanto, alta concentração de sulfito (>10 gramas/kg) provoca destruição irreversível da antocianina para chalconas.

eq. 13.3



- Ácido ascórbico

O ácido ascórbico é um agente nucleofílico natural que acelera a destruição da antocianina. Acredita-se que a principal causa disso seja a auto-oxidação do ácido ascórbico, com formação de H_2O_2 . A água oxigenada formada promove a oxidação do núcleo *flavilium*, levando à formação de substâncias incolores.

- Metais

As antocianinas, que possuem sistema O-diidroxilado (anel B), complexam-se com metais, alterando sua coloração. Estes complexos são mais estáveis aos efeitos do pH e da luz que os compostos similares. Cianidina-3-glicosídica na presença de alumínio em pH 5,5 forma um complexo vermelho e, em presença de sais de ferro em pH acima de 5,5, um complexo azul. O aparecimento da coloração azulada em pêssegos enlatados é devido à complexação com zinco, e a perda da coloração rósea em peras se deve ao complexo *cianidina-zinco*.

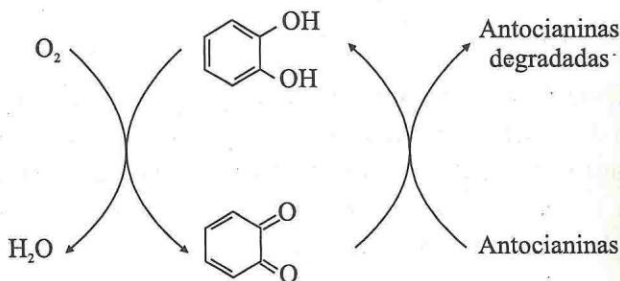
- Aquecimento

Os pigmentos são degradados em temperatura acima de 60°C, ocorrendo hidrólise da ligação 3-glicosídica, liberando a aglicona, e abertura hidrolítica do anel, com formação do derivado de chalcona, que se degrada a compostos escuros insolúveis de natureza polifenólica. A estabilidade das antocianinas à degradação térmica aumenta com a diminuição do pH e ausência de oxigênio.

- Enzimas

Glicosidase e PPO estão envolvidas na descoloração de antocianinas. A glicosidase remove o açúcar, resultando na diminuição da solubilidade da antocianina e em sua transformação em produto incolor. Os estágios subsequentes de descoloração foram descritos anteriormente. O branqueamento, utilizado na inativação enzimática, ajuda na retenção da coloração, diminuindo a velocidade da reação de escurecimento. A PPO atua na presença de O-difenol e O₂, oxidando a antocianina. A enzima inicialmente oxida O-difenol para O-benzoquinona, a qual reage com a antocianina por mecanismo não-enzimático, formando produtos de degradação (eq. 13.4).

eq. 13.4



Caramelo

Corante castanho-escuro resultante do aquecimento controlado de açúcares em temperatura acima de seu ponto de fusão. Ácidos, bases ou sais são adicionados em pequenas quantidades para aumentar a taxa de caramelização e obter características desejáveis para aplicação em diversos produtos.

O caramelo consiste de uma mistura complexa de polímeros de composição indefinida, bem como de uma variedade de componentes voláteis. O processo pode ser direcionado para se obter maior formação de aroma e, ou, maior acúmulo de pigmento.

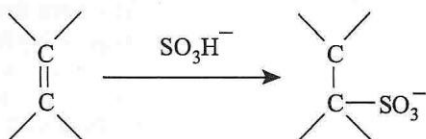
Diferentes açúcares podem ser utilizados na fabricação de caramelo: sacarose, glicose, frutose, xarope de milho e amido. As condições da reação dependem do produto final, ou seja, da capacidade de escurecimento, do *flavor*, da solubilidade em álcool e ácidos e da compatibilidade com taninos ou com proteínas.

Em linhas gerais, o monossacarídeo ou polissacarídeo é aquecido entre 120 e 180 °C por período de cinco a dez horas na presença de catalisadores: ácido, base, sulfito, hidróxido de amônia ou carbonato de amônia. Diversos tipos de caramelos podem ser, entretanto, produzidos: caramelo obtido pelo aquecimento do açúcar com hidróxido de amônia ou carbonato de amônia, caramelos com cargas negativas produzidos com ácido sulfúrico, sulfito de cálcio ou de amônia, caramelos com estabilidade alcoólica obtidos na presença de catalisadores alcalinos etc.

Se o ácido sulfúrico ($\text{pH} = 3,5$) é utilizado como catalisador, o produto final apresenta intensa coloração, é estável em meio ácido e não precipita na presença de taninos ou álcoois. Quando o catalisador é o hidróxido de sódio ($\text{pH} = 9,5$), a coloração final é também intensa e estável em álcool, mas precipita com taninos ou em solução alcalina. O caramelo obtido com a utilização de sais de amônia possui estabilidade inferior.

O processo pode ser direcionado para a formação de aromas. O aquecimento do xarope de sacarose em meio tamponado aumenta a fragmentação molecular do açúcar e, portanto, a formação de substâncias aromáticas. Por outro lado, o aquecimento do xarope de glicose com ácido sulfúrico na presença de amônia provoca a formação de polímeros intensamente coloridos.

A estabilidade e a solubilidade desses polímeros aumentam com a adição do ânion bissulfito à ligação dupla (eq. 13.5).



eq. 13.5

Em solução, o caramelo forma colóides e sua função está relacionada com a carga elétrica. Assim, o conhecimento do ponto isoelétrico é importante para a estabilidade e funcionalidade em aplicações específicas, sendo a carga líquida crítica na utilização em determinados produtos.

O caramelo em solução aquosa pode estar carregado positiva ou negativamente, dependendo do processo de fabricação e do pH do meio. Se positivamente carregado (uso de amônia), pode interagir com moléculas negativamente carregadas presentes no alimento, provocando sua precipitação.

Em bebidas, o caramelo requer cargas fortemente negativas (sais de amônia), enquanto em produtos de panificação e cerveja a mistura de caramelos utilizada deve possuir cargas positivas. Caramelo livre de sulfito apresenta ponto isoelétrico em pH entre 6,0 e 7,0, disponível na forma de pó e não tão higroscópico como o caramelo-padrão, o que lhe confere boa estabilidade. Geralmente, é encontrado em mistura com outros corantes, utilizada em café, bebidas enlatadas, doces, misturas em pó para bebidas e produtos de confeitaria.

Extração de Pigmentos: Beterraba e Uva

As formas químicas de alguns pigmentos são facilmente alteradas em condições que afetam a integridade estrutural do tecido. Aquecimento, alterações de pH e reações de oxidação podem afetar a qualidade do pigmento. Os pigmentos presentes em vegetais podem ser

categorizados como *carotenóides*, *clorofilas* e *flavonóides*. Incluso no grupo dos flavonóides estão os compostos fenólicos que são substratos nas reações enzimáticas de descoloração de frutas e vegetais.

As betalaínas são mais hidrossolúveis que as antocianinas, além de apresentarem poder tintorial três vezes maior. A estabilidade em pH na faixa de 3 a 7 torna sua aplicação em alimentos mais adequada que as das antocianinas, as quais perdem a coloração.

Durante o processamento, as betalaínas são liberadas, sendo afetada por diversos fatores, como pH, atividade de água, exposição à luz, íons metálicos, temperatura e enzimas. Entretanto, dentro da faixa ótima de pH a temperatura é o fator limitante para a sua decomposição. A adoção do pH = 4,0 é recomendada durante o processamento de beterraba, com a finalidade de precipitar proteínas, além de permitir o tratamento térmico mais brando (pasteurização em vez de esterilização).

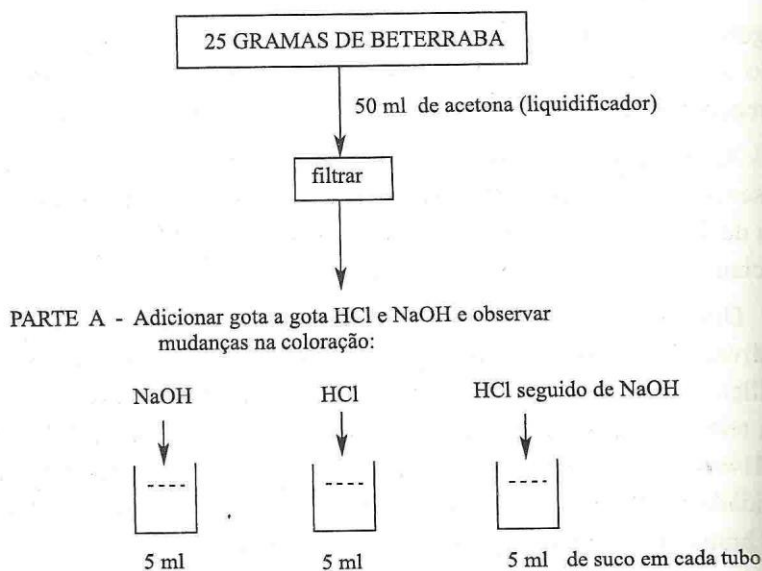
Reagentes

- HCl 5,0% , NaOH 5,0% e FeCl₃ 5,0%.
- Ác. ascórbico 100 ppm e NaHSO₃ 1,0%.

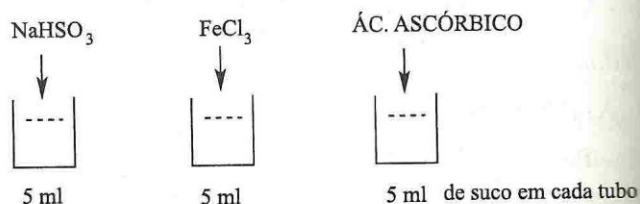
Procedimento

A) Beterraba

- Bater em liquidificador 25 gramas de beterraba com 50,0 ml de acetona, filtrar e transferir 5,0 ml para os tubos de ensaio.
- Adicionar, gota a gota, os reagentes conforme o fluxograma a seguir.
- No terceiro tubo, adicionar HCl em quantidade suficiente (gota a gota) e NaOH para produzir mudanças na coloração.
- Especular as reações de mudanças na coloração provocadas pela adição dos reagentes.



PARTE B - Adicionar 5,0 ml dos reagentes abaixo em 5,0 ml de suco e observar mudanças na coloração:



B) *Suco de uva* - Obter 30,0 ml de suco de uva e dividir em ~~seis~~ porções, conforme os fluxogramas a seguir.

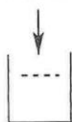
Parte A

- No primeiro tubo, adicionar NaOH gota a gota e observar a mudança de coloração.
- No segundo tubo de ensaio, adicionar HCl gota a gota e observar a mudança de coloração.
- No terceiro tubo, adicionar HCl até a mudança de coloração e então, adicionar NaOH até alterá-la.

30 ml SUCO DE UVA

PARTE A - Adicionar gota a gota HCl e NaOH e observar mudanças na coloração:

NaOH



5 ml

HCl



5 ml

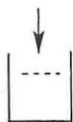
HCl seguido de NaOH



5 ml de suco em cada tubo

PARTE B - Adicionar 5,0 ml dos reagentes abaixo e observar mudanças na coloração:

NaHSO_3



5 ml

FeCl_3



5 ml

Ác. Ascórbico



5 ml de suco em cada tubo

Parte B

- Preparar a mistura contendo 10 ml de suco de uva + 90 ml de água e determinar o pH (solução-estoque).
- Remover de 5 a 10 ml da solução-estoque para tubo de ensaio e deixá-lo em repouso (frasco A).
- Ajustar o pH da solução-estoque para 5,0 com NaOH 1,0N e remover de 5 a 10 ml (frasco B).
- Ajustar o pH da solução-estoque para 7,0 e remover de 5 a 10 ml (frasco C).
- Ajustar o pH da solução-estoque para 10 e remover de 5 a 10 ml (frasco D).
- Comparar a coloração das amostras e ilustrar os efeitos químicos da alteração do pH na molécula da antocianina.

ISOFLAVONÓIDES

Introdução

Os vegetais produzem uma grande variedade de compostos de baixo peso molecular, que, por serem considerados não-funcionais, ou seja, não estão diretamente relacionados a processos como fotossíntese, respiração etc., denominam-se metabólitos secundários. Estes são divididos em três grupos: *terpenos*, *compostos fenólicos* e *produtos nitrogenados*, como os *alcalóides*.

Entre esses compostos são encontrados os flavonóides, considerados a maior classe de compostos fenólicos presentes em frutas, vegetais e grãos. Mais de 6.000 diferentes tipos são conhecidos, e muitos deles apresentam *efeitos biológicos potenciais* no controle dos níveis de colesterol, osteoporose e eventos carcinogênicos, bem como no aumento da capacidade antioxidante.

Os flavonóides são derivados da biossíntese do aminoácido aromático (fenilalanina) e do ciclo de Krebs (acetil CoA), sendo utilizados pelas plantas em várias situações. Um exemplo é a sua participação na fixação simbiótica do nitrogênio. Todas as plantas requerem uma fonte reduzida de nitrogênio. Embora o gás mais abundante na atmosfera seja o nitrogênio (N_2), as plantas são incapazes de utilizá-lo diretamente. Portanto, necessitam deste na forma reduzida no solo ou na presença de bactérias (*Rhizobium*) redutoras de nitrogênio.

A forma reduzida do N_2 é a amônia (NH_4^+). Essa associação simbiótica é limitada principalmente a plantas da família leguminosa. A fixação do nitrogênio pela bactéria *Rhizobium* ocorre por meio da reação

da nitrogenase somente após estabelecida a relação simbiótica. Isso requer a penetração da bactéria na raiz e sua diferenciação no organismo denominado bacteróide. Ao que parece, as raízes exsudam substâncias flavonóides, que induzem ou reprimem os genes-chave (nod) na bactéria; portanto, na sua ausência, a fixação do nitrogênio não ocorre. O isoflavonóide genisteína é um conhecido estimulante de bactérias fixadoras de N_2 .

Entre as substâncias fenólicas sintetizadas pelas plantas de importância biológica por apresentarem atividade estrogênica (estrutura e função similar ao hormônio estradiol), incluem-se as isoflavonas (*genisteína*, *daidzeína* e *gliciteína*), lignanas (*matairésinol* e *secoisolariciresinol*), coumestanas (*coumestrol*) e estilbene (*transresveratrol*). As lignanas, componentes da lignina da parede celular, encontradas em frutas, cereais e vegetais, são convertidas pelas bactérias intestinais em fitoestrógenos *enterolactona* e *enterodiol*, respectivamente. Entre as coumestanas (semente de alfalfa, ervilha e feijão), o *coumestrol* é o mais comum, e o *transresveratrol* é o estilbene presente em vinho tinto.

Os fitoestrógenos mais comuns e estudados são os isoflavonóides genisteína, daidzeína e gliciteína. Possuem distribuição restrita no reino vegetal, sendo encontrados principalmente nas leguminosas. Quantidades relevantes são encontradas em produtos derivados da soja, sendo esses teores influenciados principalmente pelas condições de crescimento da planta. Entretanto, esses produtos participam com pequena parte da dieta ocidental.

Química dos Isoflavonóides

A estrutura básica dos flavonóides consiste de 15 carbonos distribuídos em dois anéis aromáticos interligados via carbono heterocíclico do pirano (Figura 14.1). Os anéis aromáticos são denominados A e B. A posição do anel B é a base para se distinguir a classe dos flavonóides (posição 2 do anel heterocíclico) e a posição 3, a subclasse dos isoflavonóides.

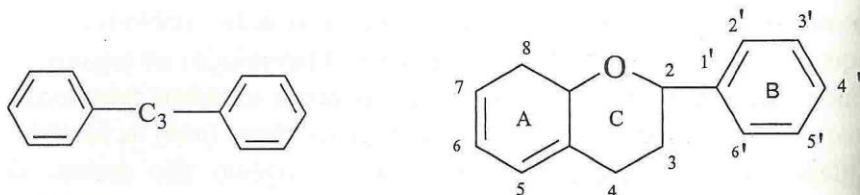


Figura 14.1 - Estrutura básica do flavonóide ($C_6 - C_3 - C_6$).

O anel A é derivado do ácido acético (acetil-CoA) e malonato (carbonos 5 até 8), enquanto o anel B e os três carbonos da ponte são derivados do ácido shiquímico via biossíntese do aminoácido fenilalanina (2 até 4 e 1' até 6'). Os flavonóides são classificados pelo grau de oxidação dos três carbonos que formam a interligação com os anéis.

Os grupos hidroxila são encontrados preferencialmente nos carbonos, nas posições 4, 5 e 7, e a maioria dos flavonóides de ocorrência natural são glicosídeos, isto é, apresentam açúcar na molécula. A presença de grupos hidroxila e açúcares aumenta as propriedades hidrofílicas da molécula, enquanto a ligação com ésteres metílicos ou unidades modificadas de isopentenil aumenta as características hidrofóbicas.

A principal característica estrutural que difere as isoflavonas dos outros flavonóides é a mudança de posição do anel B (Figura 14.2). As isoflavonas pertencem à classe dos flavonóides, com limitada distribuição na natureza, sendo encontradas principalmente nas leguminosas (soja, feijão, ervilha, amendoim etc.). As principais são a genisteína, daidzeína e gliciteína, sendo relevantes as quantidades encontradas em soja, cujos teores são influenciados pelas variedades e condições de crescimento da planta. Entretanto, outros vegetais que não a soja contribuem com pequenas quantidades na alimentação e quando considerados em conjunto, representam quantidade significativa de isoflavona na dieta.

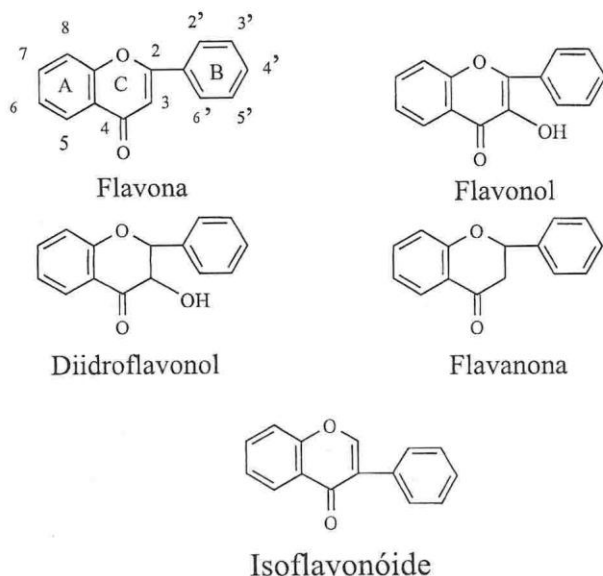
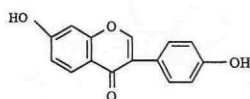


Figura 14.2 - Esqueleto e numeração das classes de flavonóides.

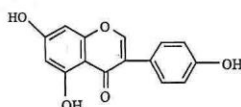
Cerca de 20 das 1.300 espécies de legumes são utilizadas na alimentação. Pelo menos 14 tipos de isoflavonas são encontrados em quatro formas: *aglicona* (daidzeína, genisteína, gliciteína, biochanina A e formononetina), *glicosídica* – carboidrato ligado ao C-7 da isoflavona (daidzina, genistina e glicitina), *malônica* (malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina) e *acetila* (acetildaidzina, acetilgenistina e acetilglicitina) (Figura 14.3).

1 – Agliconas



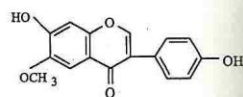
Daidzeína

(4', 7-diidroxisoflavona)



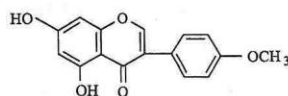
Genisteína

(4', 5, 7-triidroxisoflavona)

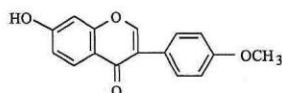


Gliciteína

(7, 4' -diidroxisoflavona)

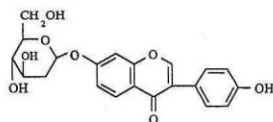


Biochanina A

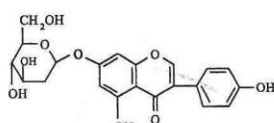


Formononetina

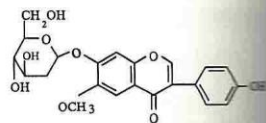
2 – Glicosídicas



Daidzina

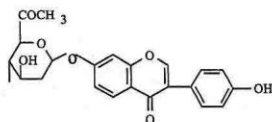


Genistina

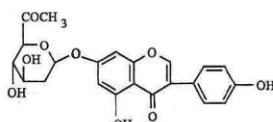


Glicitina

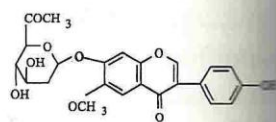
2.1 – Acetiladas



Acetildaidzina

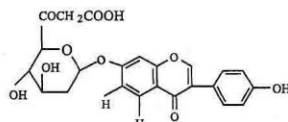


Acetilgenistina

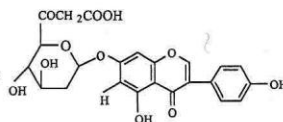


Acetilglicitina

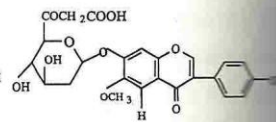
2.2 – Malonica



Malonildaidzina



Malonilgenistina



Malonilglicitina

Figura 14.3 - Estrutura química dos isoflavonóides isômeros.

Propriedades Biológicas das Isoflavonas

As isoflavonas são compostos difenólicos heterocíclicos de ocorrência natural pertencentes ao subgrupo dos flavonóides, associados com diversos benefícios *in vivo* na prevenção de uma variedade de doenças crônicas. Em função da sua atividade estrogênica, são conhecidas como fitoestrógenos, exibindo diversas funções fisiológicas nos tecidos animais. Contudo, nem todos os benefícios das isoflavonas estão associados com a sua atividade estrogênica. Por exemplo, a genisteína inibe a DNA topoisomerase e tirosina quinase, bem como possui atividade antioxidante. A daidzeína não apresenta atividade de inibição sobre a tirosina quinase.

Os efeitos benéficos das isoflavonas não podem ser explicados somente por sua interação com os receptores de estrógeno. No caso da genisteína (5,7,4'-tridroxisoflavona), a principal isoflavona, numerosos mecanismos biológicos são conhecidos, incluindo a sua participação na regulação de eventos hormonais, inibição da tirosina quinase e atividades da DNA topoisomerase. Um dos mecanismos de prevenção propostos envolve a interação com os receptores estrogênicos e subsequente perturbação dos mecanismos controlada pelo estradiol.

Ultimamente, diversos estudos têm sido realizados buscando uma ligação entre as isoflavonas com o metabolismo hormonal e a atividade biológica de enzimas intracelulares na síntese de proteína, nos fatores de crescimento e na proliferação de células malignas e doenças cardiovasculares em bases moleculares, bem como a relação dos níveis de isoflavonas no organismo e nos tecidos.

A biodisponibilidade, assim como a atividade biológica das isoflavonas, depende da forma química em que elas se encontram. Nas diversas variedades de leguminosas, a concentração de isoflavonas varia consideravelmente e necessita ser estudada, uma vez que poucos autores descrevem a sua distribuição em alimentos, à exceção da soja. A habilidade das isoflavonas na prevenção do câncer e de outras doenças crônicas depende da sua absorção, metabolismo, distribuição para o tecido-alvo e excreção. A dose necessária para obter efeito desejável e evitar efeitos indesejáveis ainda não foi determinada.

As isoflavonas apresentam similaridade funcional e estrutural com os estrógenos naturais. Ligam-se fracamente aos receptores

estrogênicos, promovendo a competição com o estrógeno natural; na presença de altos níveis, podem atuar como antiestrogênicos. Os efeitos benéficos listados na literatura científica foram obtidos a partir de evidências, utilizando-se fontes relativamente elevadas desses compostos, como a soja. Entretanto, alimentos contendo pequenas quantidades de isoflavonas são mais comuns na dieta humana, podendo apresentar efeitos cumulativos mais significativos, especialmente se diferentes fontes são utilizadas no dia-a-dia.

Por muito tempo, o interesse pela soja era limitado ao seu elevado teor e qualidade da proteína. Entretanto, na última década, os seus derivados têm sido extensivamente investigados na prevenção de doenças crônicas dependentes e independentes de hormônio. Dentre os seus componentes, especula-se que os isoflavonóides sejam em parte os responsáveis pela extensa atividade biológica, destacando-se suas propriedades potenciais *anticarcinogênicas*, *antioxidantes* e *estrogênicas*.

Estrógenos: mecanismo de ação

Estrógeno pode ser definido como qualquer substância química capaz de se ligar aos receptores estrogênicos, afetando a transcrição de genes. Os isoflavonóides possuem massa molecular e metabolismo semelhantes aos dos esteróides, mas com diferenças claras quanto a seu efeito nas células. Em razão da sua atividade estrogênica na espécie humana, são denominados fitoestrógenos.

Dois receptores estrogênicos (α e β) estão presentes na espécie humana com diferente distribuição celular e concentrações nos tecidos; entretanto, os benefícios do efeito destes fitoestrógenos estão além da simples interação com os receptores.

Nos últimos anos, em razão de suas propriedades bioativas, os isoflavonóides estão sendo testados na prevenção de diversas enfermidades, como a osteoporose e certos tipos de câncer. Estima-se entre 40 e 50 mg/dia a ingestão diária de isoflavonóides pela população asiática, representando consumo no mínimo dez vezes maior que o dos povos ocidentais, com reflexo associado à baixa incidência de câncer dependente e independente de hormônios, doenças cardiovasculares e osteoporose.

Atividade estrogênica e antiestrogênica

Em razão de suas atividades estrogênicas, as isoflavonas têm sido recentemente muito estudadas, mas os efeitos da interação com os receptores de estrógenos necessitam ainda ser elucidados. Atualmente, mais de 300 plantas são conhecidas por possuírem substâncias com essa atividade, sendo genericamente denominadas fitoestrógenos; em vegetais, a família mais abundante é a das leguminosas.

As isoflavonas são classificadas como fitoestrogênicas (potência estrogênica: genisteína > daidzeína > gliciteína)³ por terem estrutura e peso molecular similares aos do hormônio endógeno estrógeno (Figura 14.4) com atividade $100.000 < \text{estradiol in vivo}$, possuindo, assim, habilidade de se ligar aos receptores hormonais α e β .

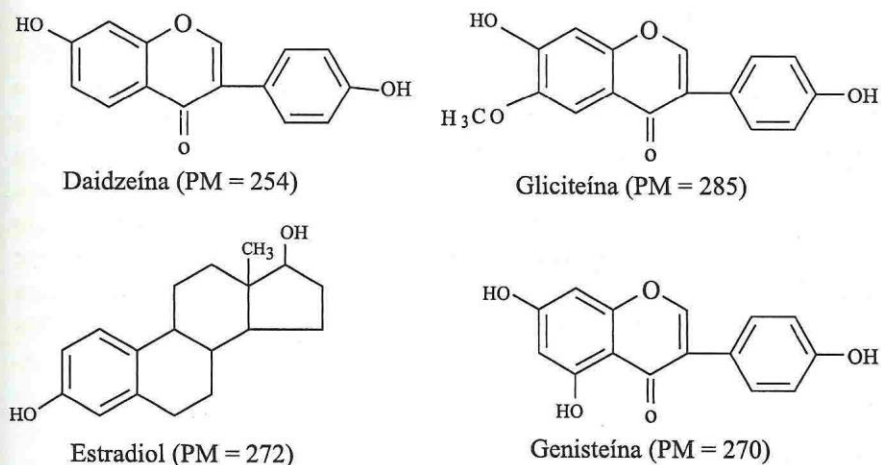


Figura 14.4 - Estrutura molecular do estradiol, genisteína, daidzeína e gliciteína.

A genisteína tem preferência pelo receptor β , localizado nos tecidos não-reprodutivos, como ossos, cérebro, útero, próstata e pulmão, enquanto os receptores endógenos têm afinidade pelo receptor α , localizado principalmente nos tecidos reprodutivos mama (α e β), útero (α e β), ovário (α e β) e testículos (α), estimulando a transcrição de genes específicos nas células. Entretanto, competindo com o estradiol, podem

também atuar como antagonista ao estrógeno, reduzindo a disponibilidade deste nas células. Estes efeitos agonista/antagonista dependem de diversos fatores, incluindo a concentração do fitoestrógeno, números de receptores e nível de estrógeno endógeno. A afinidade da genisteína pelo receptor β é 20 vezes maior que pelo α , sugerindo efeito seletivo pelo tecido.

Comparado com o estradiol, a afinidade da daidzeína pelos receptores α e β é de 0,1% e 0,5%, respectivamente. Estas substâncias parecem ter ações estrogênicas seletivas, isto é, em alguns tecidos apresentam respostas positivas, enquanto em outros inibem o efeito estrogênico.

A atividade estrogênica é dependente da afinidade para se ligar aos receptores, que é determinada pela presença do anel aromático, bem como pela distância (11,5 °Å) entre os grupos hidroxila localizados nas posições 4' e 7. A similaridade química das isoflavonas e o estradiol conferem a habilidade de se ligarem a receptores estrogênicos e a proteínas ligadas ao hormônio sexual. Comparados com o estradiol, a genisteína e a daidzeína ligam-se a receptores estrogênicos com afinidades variáveis entre 100 e 1.000 vezes menos, respectivamente. Efeitos antiestrogênicos podem ocorrer pela inibição competitiva pelo receptor, pela inibição da síntese do estrógeno ou pelo aumento da síntese da proteína de ligação com estrógeno. Mesmo apresentando baixa afinidade pelos receptores, podem estar presentes em concentrações elevadas, capazes de provocar efeitos biológicos.

Metabolismo das isoflavonas

Os fitoestrógenos da família das isoflavonas ocorrem em numerosos vegetais utilizados na alimentação humana e animal. Existem diversas fontes de isoflavonas que fazem parte da dieta humana, incluindo ovos, legumes, frutas e vegetais, cujos valores ($\geq 100 \mu\text{g.kg}^{-1}$), são bastante reduzidos se comparados aos da soja ($1-4 \text{ mg.g}^{-1}$).

Após a ingestão, as isoflavonas são biotransformadas no trato intestinal, sendo esse processo altamente dependente da natureza da microflora intestinal. Isso sugere que qualquer alteração da flora intestinal pode afetar a sua disponibilidade. As formas glicosídicas

daidzina e genistina são hidrolisadas pela β -glicosidase intestinal para as formas agliconas, as quais são então absorvidas e, adicionalmente, metabolizadas para metabólitos estrogênicos e não-estrogênicos (Figura 14.5).

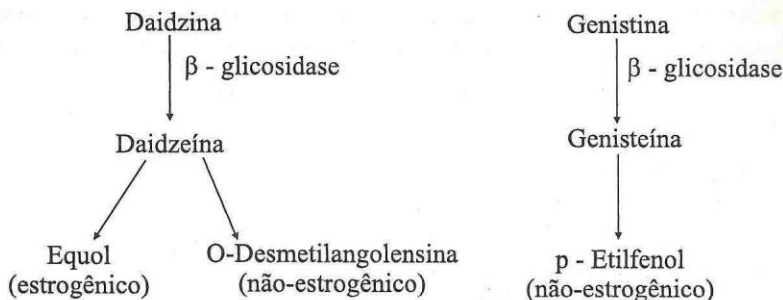


Figura 14.5 - Biotransformação de isoflavonas no intestino.

Mesmo com todo interesse nesse assunto, dados disponíveis sobre absorção e metabolismo das isoflavonas na espécie humana e animal são ainda limitados. A absorção intestinal é variável entre indivíduos, sendo influenciada pela dieta e flora intestinal. As formas agliconas são eficientemente liberadas a partir de suas respectivas formas glicosídicas e sujeitas, em parte, ao metabolismo pelas bactérias intestinais. Por exemplo, os metabólitos bacterianos típicos da daidzeína são a deidro-daidzeína, O-desmetilangolensina e equol (Figura 14.6). Esses metabólitos e as isoflavonas que escaparam da biotransformação bacteriana são absorvidos pelo intestino, onde posteriormente são liberados na corrente sanguínea e distribuídos para os tecidos periféricos. No fígado e em alguns outros tecidos, são convertidos em formas conjugadas com o ácido glucurônico, sulfato e produtos metilados excretados na urina e na bile.

Todas as isoflavonas são eficientemente absorvidas pelo trato intestinal, sendo as formas agliconas mais eficientes em absorção. O tempo médio de absorção da genisteína e da daidzeína é de 5,2 e 6,6 horas, respectivamente, enquanto o dos correspondentes glicosídios é de 9,3 e 9,0 horas, consistente com o tempo de residência necessário para a hidrólise da ligação glicosídica.

O significado biológico desses compostos ainda não está claro, e as vias metabólicas das isoflavonas ainda não foram claramente definidas. A

biochanina A e formononetina são desmetiladas pelas bactérias intestinais, originando genisteína e daidzeína, respectivamente (Figura 14.6), e as formas agliconas são mais bioativas. A atividade biológica das isoflavonas é alterada pela estrutura química. Por exemplo, a formononetina é a menos estrogênica e antioxidante das isoflavonas, enquanto os metabólitos intestinais daidzeína e equol são mais potentes.

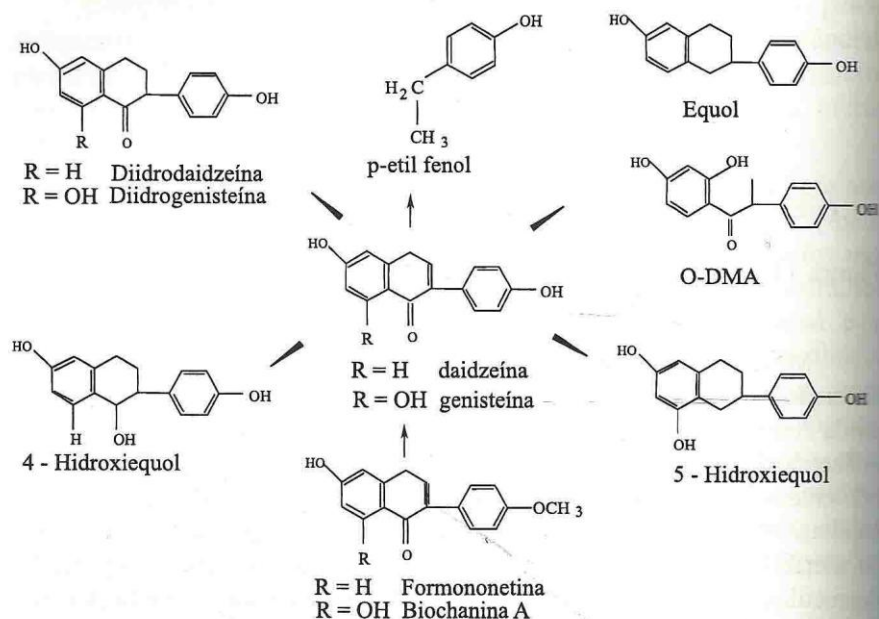


Figura 14.6 - Estrutura dos produtos metabólicos dos isoflavonóides.

A daidzeína e a formononetina após transformação intestinal microbiana liberam o isoflavonóide equol (~70%) e O-desmetilangolesina (O-DMA) pela abertura do anel. Outros intermediários formados durante essa conversão são a diidroxidaidzeína, 4-hidroxi-equol, e 2-deidro-O-DMA. A genisteína é metabolizada no intestino pela clivagem de seus anéis aromáticos, formando o p-etil fenol, que não é estrogênico. Outros compostos identificados incluem a diidroxigenisteína, 6-OH-O-DMA, enterolactona e o enterodiol. Entretanto, somente 7 - 30% da quantidade ingerida de daidzeína e genisteína é recuperada na urina e nas fezes. A formação de metabólitos desconhecidos pode explicar essa baixa recuperação.

Estudos realizados *in vitro* mostram que a daidzeína é convertida em nove metabólitos, sendo quatro monoidroxilados, quatro dihidroxilados e um trihidroxilado. No caso da genisteína, os produtos resultantes foram quatro monoidroxilados e dois trihidroxilados. Entretanto, estas formas hidroxiladas podem apresentar outras atividades biológicas diferentes dos compostos originais. A genisteína é descrita como inibidora das enzimas topoisomerases e tirosina quinase, enquanto a daidzeína, que difere estruturalmente por uma hidroxila (Figura 14.3), exibe diferentes propriedades biológicas.

A genisteína é extensivamente metabolizada *in vivo*, e somente de 14-16% é excretada na forma não-modificada. A sua interação, bem como de outros polifenóis, com oxidantes produzidos a partir de células inflamatórias (HOCL, HOBr e ONOO-) aumenta substancialmente a sua atividade biológica. Do ponto de vista de absorção, a daidzeína é mais absorvida, provavelmente devido à maior degradação pela flora microbiana da genisteína e não por diferenças na solubilidade entre os compostos.

Os efeitos biológicos das isoflavonas variam de tecido para tecido e, em cada tipo, estas apresentam afinidade por receptores específicos. Esses efeitos ainda não são suficientemente elucidados em nível molecular. Entretanto, estudos têm demonstrado que as isoflavonas possuem mecanismos gerais de ação que podem interferir no metabolismo de muitos nutrientes, inclusive daqueles relacionados aos processos bioquímicos em doenças crônicas, como câncer, diabetes, cardiovasculares e osteoporose.

Os mecanismos de ação dividem-se em dois tipos de categorias: o efeito *genômico* e o *não-genômico*. No primeiro caso, acredita-se no envolvimento com as moléculas receptoras de estrógenos no núcleo, resultando na alteração da expressão de proteínas celulares. São possíveis dois efeitos genômicos: efeito estrogênico fraco, em que a molécula do fitoestrógeno pode ativar a interação do receptor estrógeno-DNA em menor grau que o estradiol, ou uma grande quantidade de moléculas de fitoestrógenos que podem deslocar o estradiol do receptor, reduzindo o nível de ativação (efeito antiestrogênico).

Pelo mecanismo não-genômico, pode-se alterar a atividade de certas proteínas por meio de mecanismos provavelmente diferentes do estradiol, inibindo a atividade de certas proteínas celulares reguladoras, a

exemplo da tirosina quinase e topoisomerasas que auxiliam na regulação, diferenciação e replicação celular.

Isoflavonóides e hipercolesterolemia

Níveis elevados de colesterol no sangue são considerados o principal fator de risco associado a doenças cardíacas. Esta associação é devida à importância do colesterol, especialmente o LDL (lipoproteína de baixa densidade) na formação e desenvolvimento de placas arterioscleróticas, e as modificações oxidativas do LDL são consideradas importante no desenvolvimento desse processo. A concentração de colesterol e os níveis de LDL no sangue são influenciados pela dieta. A estratégia comumente utilizada para redução do LDL inclui mudanças na ingestão de diversos nutrientes, entre eles gorduras, colesterol, carboidratos e proteínas.

Estudos recentes sugerem a utilização de outros meios alternativos pelo aumento da ingestão de isoflavonóides associados à vitamina C. Especula-se que o efeito protetor esteja relacionado com a estabilização da estrutura protéica pela interação do fitoestrógeno com o LDL. Alterações na sua estrutura os tornam muito sensíveis à formação de produtos peroxidados. O efeito sinérgico da interação do fitoestrógeno e vitamina C pode ser devido à combinação de processos distintos. A ação da vitamina C facilita a decomposição dos peróxidos para espécies não-radicais, limitando a formação de radicais lipídicos.

As isoflavonas têm a capacidade de diminuir os níveis totais de colesterol VLDL e LDL e de aumentar o HDL, mas esse efeito redutor é normalmente associado a indivíduos com altas taxas, não apresentando efeito em indivíduos normais. A genisteína aumenta a expressão do gene receptor de LDL e inibe a ativação de plaquetas e a atividade dos fatores de crescimento.

A inibição desses processos pode ser atribuída, em parte, ao fato de a genisteína ser inibidora da tirosina proteína quinase. Esta enzima realiza a fosforilação da tirosina nos diversos fatores de crescimento localizados nos receptores celulares e, conseqüentemente, altera o mecanismo de proliferação celular. A atividade desta enzima é necessária para a sinalização de fatores de crescimento intracelulares, como os derivados

de plaquetas, que, acredita-se, têm um papel na migração de células e proliferação da arteriosclerose.

Isoflavonóides e câncer

Os isoflavonóides apresentam propriedades anticarcinogênicas via ligação com receptores estrogênicos e outros mecanismos, não envolvendo os receptores, incluindo a inibição da proteína tirosina quinase, DNA topoisomerase I e II, 7 β -hidroxiesteróide deidrogenase, 5 α -redutase, aromatasas e aumento da síntese hepática do hormônio sexual ligante à globulina.

Especula-se que a baixa incidência de câncer da próstata e dos seios na Ásia se deve à elevada ingestão de isoflavonas (40-80 mg/dia). A genisteína inibe a DNA topoisomerase, envolvida no mecanismo de replicação e reparo, sendo, portanto, fundamental na proliferação e diferenciação de células. A enzima corta e religa o DNA, formando um complexo intermediário removível entre ambos. A isoflavona genisteína atua como inibidora da topoisomerase I e II, estabilizando esse complexo.

Alguns tipos de câncer são inicialmente hormônios dependentes, de forma que qualquer substância que altere o metabolismo ou a disponibilidade dos hormônios sexuais pode influenciar o desenvolvimento dessa doença. Os fitoestrógenos estimulam a síntese da globulina ligante a hormônios sexuais (SHBG) *in vitro*, o que resulta na diminuição da porcentagem de testosterona e de estradiol livre, reduzindo a fração de hormônios livres e ligados à albumina. Isso reduz a taxa de remoção metabólica dos esteróides e de sua atividade metabólica. Níveis elevados de SHBG e baixos de estradiol e testosterona ocorrem em vegetarianos, os quais apresentam baixa incidência dessas doenças.

A enzima aromatase catalisa a conversão de andrógenos em estrógenos, e inibidores da enzima são comumente utilizados no tratamento de câncer dos seios. Os fitoestrógenos são inibidores moderados da aromatase *in vitro*, sugerindo possível utilização destes. As isoflavonas podem influenciar o metabolismo de esteróides endógenos pela inibição da 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase e 5 α -redutase. Estas enzimas são responsáveis pela conversão da relativamente impotente estrona em estradiol e da testosterona em 5 α -diidrotestosterona, respectivamente.

Isoflavonóides como antioxidantes

Várias doenças degenerativas estão ligadas à etiologia das *espécies reativas oriundas do oxigênio*, como oxigênio singlete, ânion superóxido, radical hidroxil e ânion peróxido (Capítulo 3). Trata-se de radicais livres altamente reativos, oriundos do oxigênio molecular e formados durante o processo normal da respiração celular, pela ativação dos leucócitos como parte do sistema imunológico e por oxidantes externos, como a poluição e a irradiação. Podem causar danos devido à sua ação maléfica sobre componentes celulares vitais, como lipídios, proteínas e DNA.

O organismo, normalmente, encontra-se em equilíbrio com os radicais livres, os quais são continuamente liberados e atenuados por diversos mecanismos de defesa. Estes compreendem enzimas endógenas (catalase, glutatona redutase e superóxido dismutase), fatores endógenos (glutatona e coenzima Q) e fatores nutricionais, principalmente antioxidantes (carotenóides, vitamina C, vitamina E e selênio). Um exemplo bem conhecido de um produto da oxidação com implicações em doenças cardiovasculares é a oxidação do colesterol ligado ao LDL; este é sabidamente mais arterogênico que sua forma nativa.

Os antioxidantes são agentes que restringem os efeitos deletérios das reações de oxidação. Estes podem ser diretos, eliminando certos radicais livres, ou indiretos, prevenindo a sua formação. A estrutura polifenólica dos isoflavonóides, que é a base antioxidante destes compostos, confere habilidade para remover radicais livres e de complexação com os metais de transição. As isoflavonas removem as espécies reativas derivadas do oxigênio, como *ânion superóxido*, *peróxido de hidrogênio* e *radicais livres*, antes que elas tenham chance de induzir danos às células. Possuem grupos hidroxila no anel A e, ou, B e, conseqüentemente, atuam como antioxidantes em sistemas celulares, doando átomos de hidrogênio/elétrons de seus grupos hidroxila para os radicais livres. Entretanto, a daidzeína e a genisteína não apresentam estrutura *orto* ou *para-difenólica*, que são características importantes da atividade antioxidante de diversos compostos fenólicos.

Outro possível mecanismo que contribui com a atividade antioxidante é a sua habilidade na estabilização das membranas celulares, promovendo a diminuição da fluidez dos lipídios nessa região. A localização dos isoflavonóides no interior da membrana e a resultante restrição na fluidez dos componentes impediriam estericamente a difusão

de radicais livres, bem como a proteção direta ou indireta pelo aumento da atividade das enzimas antioxidantes.

Modificações metabólicas dos flavonóides alteram a sua natureza antioxidante, definida pela presença do grupo catecol no anel-B (diidroxilado) capaz de doar hidrogênio (elétron) para estabilizar espécies radicais. Outra característica antioxidante importante é a presença de insaturação no anel-C e de grupos funcionais capazes de se ligar a metais de transição, como ferro e cobre (Figura 14.7). Os metabólitos circulantes dos flavonóides possuem habilidade reduzida para doar o hidrogênio e são menos efetivos na remoção de espécies reativas oriundas do oxigênio e nitrogênio.

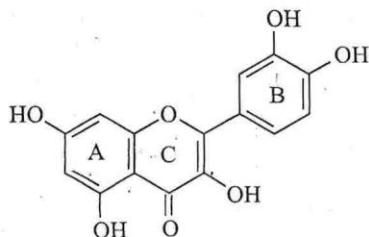


Figura 14.7 - Estrutura da quercetina, mostrando as características importantes na definição potencial dos flavonóides antioxidantes.

Os parâmetros estruturais que governam as propriedades biológicas são influenciados pelo metabolismo ou sua absorção. Os flavonóides são substratos para diversas enzimas localizadas no intestino e no cólon. As modificações metabólicas incluem a metilação do grupo catecol do anel B, alterando as suas propriedades antioxidantes, e o rompimento do anel C, formando diversos compostos fenólicos simples. Esses vários metabólitos podem ser adicionalmente absorvidos e adicionalmente metabolizados pelo fígado.

Efeito do Processamento

Os benefícios potenciais associados à ingestão de isoflavonas tiveram como desdobramento o desenvolvimento de produtos alimentícios funcionais contendo concentrações elevadas dessas

substâncias. Esses benefícios dependem da estabilidade dos isoflavonóides durante o processamento, podendo, além de alterar sua distribuição e forma no produto final, resultar em perdas por lixiviação e pela remoção de frações indesejáveis. Previamente, as isoflavonas somente eram disponíveis em alimentos, porém já são comercializadas de diversas formas, incluindo germe ou hipocótilo de soja que contém 10 vezes mais isoflavonas que os grãos, na forma de bebidas e de tabletes/cápsulas.

A questão sensorial é importante, pois as isoflavonas agliconas têm sabor amargo adstringente, impondo certa limitação na sua utilização como ingrediente funcional, enquanto os derivados glicosídeos apresentam menor intensidade. Essa conversão pode ser inibida pela glucona- δ -lactona, que atua como inibidor competitivo das β -glicosidases.

A concentração e o tipo de isoflavonas variam em função das técnicas de processamento. Não são destruídos pela maioria dos processos convencionais de processamento de alimento. Alterações substanciais podem ocorrer no açúcar (glicose) presente na molécula. As formas malônicas e acetiladas são desesterificadas em temperatura de 80 °C, sendo convertidas nas formas agliconas correspondentes. A fermentação provoca a hidrólise do glicosídeo, liberando a aglicona. Adicionalmente, técnicas de processamento acarretam perdas durante os vários estádios de preparação do alimento (fervura, congelamento, secagem etc.).

Em virtude de sua contínua disponibilidade, a soja representa a principal fonte de isoflavonas entre os vegetais (Tabela 14.1), sendo processada para a extração do óleo e produtos protéicos, como a farinha, concentrado e isolado protéico. Esses derivados apresentam diferentes teores de proteínas e são utilizados em diversas aplicações na indústria de alimentos. A farinha desengordurada contém a mais elevada concentração de isoflavonas, e a fração lipídica é virtualmente isenta.

Tabela 14.1 - Níveis de isoflavonas* em soja e ervilha

Produto	Isoflavona ($\mu\text{g/g}$)
Soja (grão)	1.953
Soja (farinha)	1.777
Soja (tofu)	279
Soja (grão verde)	182
Soja (casca)	18
Ervilha (seca)	73

*Isoflavonas: daidzeína + genisteína + formononetina + biochanina A.

O isolado protéico de soja é o principal ingrediente utilizado em alimentos industrializados. É obtido pelo tratamento alcalino da farinha desengordurada com intuito de remover as fibras insolúveis e subsequente precipitação da proteína com ácido, para remoção de açúcares solúveis (Figura 14.8). O produto final possui acima de 90% de proteína, e o teor de isoflavonóides é reduzido para 26%, devido às perdas durante as várias etapas do processamento: *extração* (19%), *precipitação* (14,5%) e *lavagem* (22,5%). O produto final, proteína isolada de soja, apresenta elevados níveis de isoflavonas agliconas, em comparação com a farinha (25 g do isolado protéico possui aproximadamente 50 mg de isoflavonas).

Nos hidrolisados, obtidos pela hidrólise enzimática das proteínas da soja, os níveis de isoflavonas dependem da sua concentração inicial no grão. No molho de soja, a concentração é muito pequena em razão das perdas ocasionadas pela longa fermentação e envelhecimento do produto. A adição da farinha de soja (até 3,0%) na farinha de trigo tem como propósito melhorar as propriedades reológicas desta, além de incorporar isoflavonas nos produtos derivados do trigo.

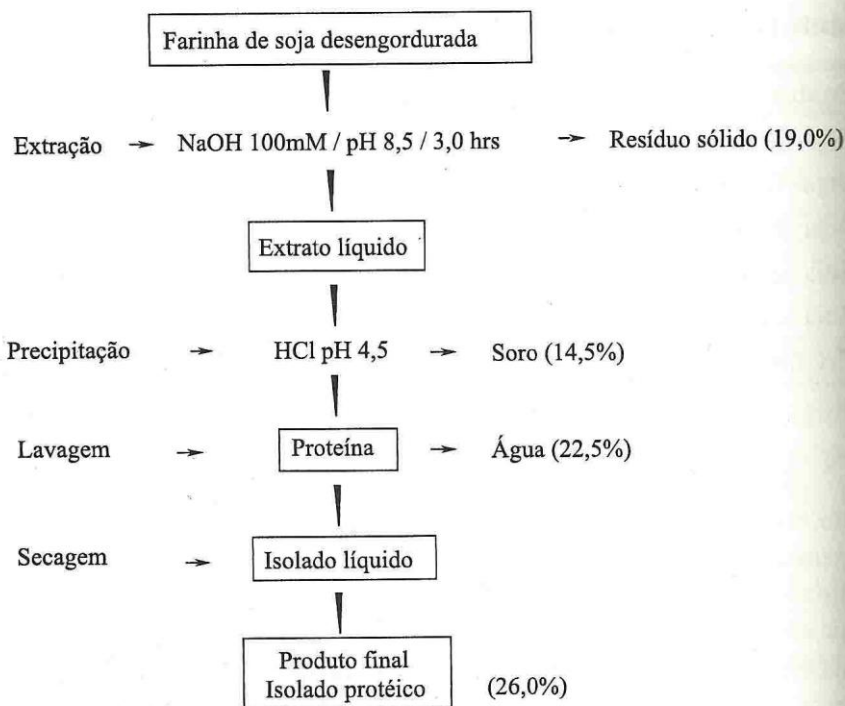


Figura 14.8 - Processamento do isolado protéico e balanço de massa do total de isoflavonóides.

As isoflavonas são parcialmente responsáveis pelo sabor amargo, azedo e adstringente. A utilização da soja imatura (maturidade de 80% e umidade entre 60 e 65%) melhora substancialmente o nível de aceitação. O teor de isoflavonóides no grão imaturo, entretanto, corresponde a 20% da soja madura. O extrato hidrossolúvel de soja por apresentar altos níveis de oligossacarídeos (causa flatulência) e *flavor* peculiar, limita a sua utilização.

Os procedimentos industriais utilizados no preparo da soja imatura ocasionam perdas de isoflavonas pela eliminação da água de cozimento. A retenção média nos diferentes processos é variável: *congelamento* (53%), *fervura* - 35 min (46%), *branqueamento* - 1,0 min (56%) e *liofilização* (40%). No caso dos grãos secos (umidade entre 12 e 15%) as perdas são mínimas, desde que a casca esteja intacta. Em razão de sua

aceitabilidade, a soja imatura pode contribuir com quantidades significativas deste nutriente após seu processamento.

A germinação da semente de soja por um período de 10 a 12 horas reduz as desvantagens do uso do grão diretamente na alimentação, melhorando as qualidades sensoriais (sabor e odor desagradáveis devido à ação da lipoxigenase) e nutritivas (presença de fatores antinutricionais: inibidor da tripsina, flatulentos e fitatos). Os benefícios do grão germinado incluem a prevenção da oxidação de lipídios, aumento no conteúdo de nutrientes, como o ácido ascórbico e riboflavina, hidrólise da rafinose e estaquiose responsáveis pela flatulência e reduz inibidores da tripsina.

O germe representa 2,0% do total do grão da soja, contendo 10 vezes mais isoflavonas que a quantidade encontrada no cotilédone, além de possuir elevada concentração de ácidos graxos polinsaturados. Comparado com a farinha de soja ($1\text{--}4\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), o germe possui entre 10 e $20\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, e as principais isoflavonas encontradas são a gliciteína e daidzeína.

Na indústria animal, a presença, na ração, de isoflavonóides oriundos da farinha de soja afeta a composição da carcaça, aumentando músculo e diminuindo a gordura em suínos; já em galinhas poedeiras, o efeito se verifica no aumento da concentração de isoflavonas na gema do ovo.

Análise e Extração

As isoflavonas são geralmente determinadas por cromatografia líquida de alto desempenho após a extração com solventes orgânicos. Coluna de fase reversa e detector de ultravioleta são necessários. O sistema de eluição utilizado é geralmente binário, consistindo uma fase de uma solução aquosa acidificada (ácido acético, ácido fórmico), denominada solvente A, e a outra fase, de um solvente orgânico menos polar, como metanol ou acetonitrila, acidificado com ácido trifluoroacético ou ácido acético.

A análise requer a utilização de padrões para identificação e quantificação. Os padrões agliconas e glicosídicos estão disponíveis no mercado, o que não ocorre com as formas malônicas e acetiladas, que, portanto, necessitam ser obtidas em laboratório.

A cromatografia de camada fina pode ser usada na identificação de isoflavonóides. O extrato metanólico é aplicado em placas de poliamida-6 e separado em metanol-ácido acético-água (90:5:5). As bandas são eluídas com metanol e novamente cromatografadas em poliamida utilizando-se a fase móvel clorofórmio-metanol-metil etil cetona (12:2:1).

Para as agliconas, a placa é cromatografada em etil acetona-éter de petróleo (3:1) e posteriormente em etanol-clorofórmio (1:1). As bandas são detectadas com a utilização da luz UV-366 nm. Outros adsorventes, como a sílica-gel, podem ser utilizados em extrato obtido com éter dietílico cromatografado três vezes em diclorometano-metanol (95:5 v/v). Placas de Kieselgel 60 F₂₅₄ em clorofórmio-metanol-2% ácido acético (7:3:1, v/v fase inferior) são visualizadas após o aquecimento a 120 °C durante 10 min com o spray 10% H₂SO₄.

O procedimento mais adequado de separação e quantificação das formas glicosídicas e agliconas envolve a utilização da cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa com detecção no UV. Entretanto, em situação em que somente os isoflavonóides agliconas são importantes, a cromatografia de fase gasosa pode ser o método de escolha.

- Preparo da Amostra

A amostra deve ser seca em estufa ou liofilizada e, posteriormente, moída e mantida em temperatura de -20 °C até a sua utilização.

- Extração dos Isoflavonóides

- coletar uma amostra, finamente moída (1,0 g) em tubos de centrífuga de 15 mL com rosca;
- adicione à amostra 10 mL de metanol 80% e 0,15 mL de padrão interno (*apigenina*, 2.000 µg.mL⁻¹ dissolvido em dimetilsulfóxido);
- aquecer em banho-maria (60 °C/2 h) com agitação;
- centrifugar a 1.200g/10 min a 4 °C;
- filtrar uma parte do sobrenadante em filtro de 0,45 µm (PVDF); e
- injetar 20 µL no HPLC.

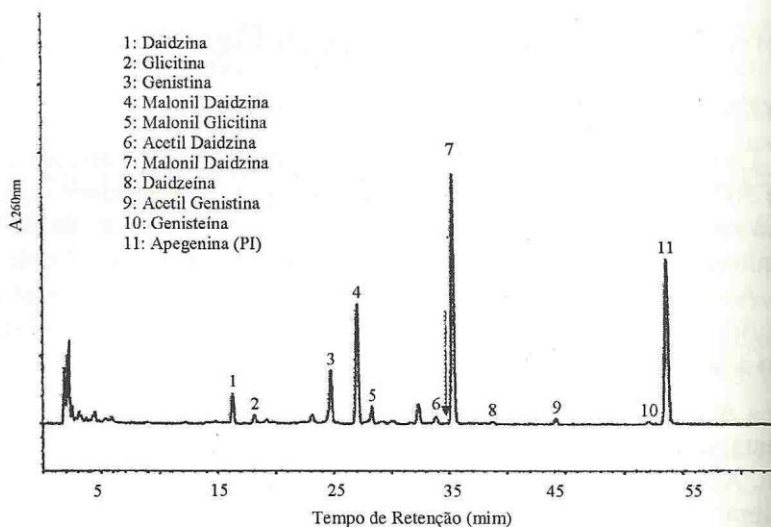


Figura 14.10 - Análise da proteína isolada de soja por cromatografia líquida de alto desempenho.

- A análise quantitativa é obtida utilizando-se curvas de calibração. A solução-padrão é injetada em triplicata e detectada sequencialmente, e o desvio-padrão é calculado para se expressar a precisão. As curvas-padrão são obtidas individualmente por meio de gráficos, variando-se a concentração das soluções-padrão em função da média das áreas dos picos obtidos no cromatograma. As concentrações das soluções-padrão devem ser escolhidas de forma a cobrir toda a faixa de isoflavonas presentes na amostra.

As retas obtidas são então caracterizadas pela inclinação (b), interseção (a) e coeficiente de correlação (R^2) e utilizadas na determinação da concentração de cada isoflavona na amostra. Calcula-se o índice de recuperação em % de cada isoflavona, relativo à quantidade de padrão interno adicionado à amostra.

- Solução-estoque

Pese em frascos de 100 mL com precisão de 0,01 mg os seguintes padrões: 0,1 g de daidzina, 0,025 g de glicitina, 0,1 g de genistina, 0,01 g de daidzeína, 0,01 g de gliciteína e 0,01 g de genisteína. Quantidade suficiente de dimetilsulfóxido é adicionada para se obter massa final de

50 g, e a concentração exata pode ser então calculada. Agite a mistura e armazene-a em frasco escuro rosqueado. A solução é estável por dois meses em temperatura ambiente. A pureza dos padrões pode ser acessada pelo CLAD-UV, dividindo-se a área do composto de referência pela área de todos os picos no cromatograma e multiplicando por 100. Resultados obtidos acima de 95% são considerados satisfatórios.

- Solução de trabalho

Pode ser preparada pesando-se 1, 2, 3, 4 e 5 g da solução-estoque em frasco de 50 mL e adicionando 1,25 mL do padrão interno. Dilua com acetonitrila 50% (v/v) e transfira os padrões diluídos para frascos escuros rosqueados e armazene-os em geladeira. Estes são estáveis por dois meses. A curva-padrão pode ser obtida graficamente, variando-se a concentração dos padrões em função da área do pico obtido no cromatograma. As concentrações das soluções-padrão devem ser escolhidas de forma a cobrir toda a faixa de isoflavonas presente na amostra.

Cromatografia de Fase Gasosa

Os isoflavonóides possuem grupos hidroxila na sua estrutura, o que dificulta a sua análise por cromatografia de fase gasosa sem que se faça *a priori* a derivatização. A formação de derivados é necessária para aumentar a volatilidade e a estabilidade térmica, sendo analisados em coluna capilar não-polar.

A amostra é hidrolisada com ácido para se obterem as formas agliconas correspondentes. Utiliza-se a biochanina A como padrão interno (75 µg) em 50 mg da amostra. A mistura é então hidrolisada em tubo com tampa, com 0,5 mL de HCL 1,0 M, durante duas horas em temperatura de 100 °C. Após a hidrólise, resfrie a amostra, neutralize-a para pH 6,5-7,0 com NH₄OH 2M, seguido pela adição de 3,0 mL de éter, e agite em vórtex.

- Derivatização

Após centrifugação, transfira a alíquota de 1,0 mL do éter para outro frasco e remova o solvente com nitrogênio. A amostra seca é então

derivatizada para éter trimetilsilil (TMSE), adicionando-se 25 μL de piridina e 50 μL de bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA). Aqueça a 60 °C durante cinco minutos.

- Cromatografia

Injete 1,0 μL da amostra derivatizada em coluna capilar tipo SPB-1 ou DB-1 de 30 m x 0,32 mm x 0,25 μm , operada nas seguintes condições: temperatura do forno, 240 °C; do injetor, 300 °C; do detector, 300 °C; razão de divisão, 20:1; e fluxo de 1,5 mL.min⁻¹. As isoflavonas são identificadas comparando-se os tempos de retenção com os padrões e quantificadas pelo fator de resposta calculado em função da biocanina A (Figura 14.11).

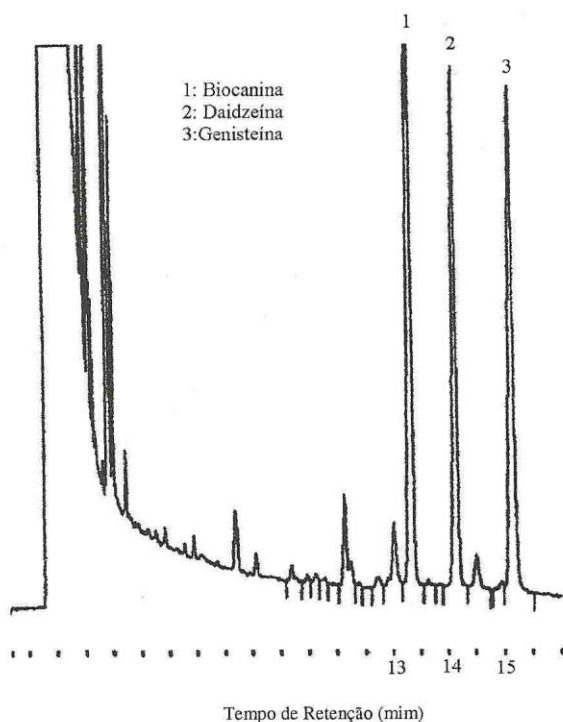


Figura 14.11 - Cromatograma dos derivados de isoflavonas agliconas em grãos de soja.

Para extrair quantidades maiores de isoflavonas agliconas, a seguinte metodologia pode ser aplicada:

-**Extração:** farinha de soja + etanol 96% (1:3).

-aquecer a 80 °C/8 h com agitação.

- filtrar a vácuo em papel- filtro Whatman # 1.

- **Hidrólise:** adicionar ao filtrado 0,13 mol/L da solução de HCl 37% e aquecer a 80 °C/6 h com agitação.

- **Cristalização:** adicionar água ao filtrado hidrolisado na proporção de 4:1, com agitação em temperatura ambiente.

- remover os cristais a vácuo em filtro de 0,2 µm.

REFERÊNCIAS

- ADLERCREUTZ, H.; HOCKERSTED, K.; WAHALA, K.; MAKELA, T. Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. **J. Steroid Biochem. Mol. Bio.**, v. 44, p. 147-153, 1993.
- ADLERCREUTZ, H. Phyto-estrogens: State of art. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 7, p. 201-207, 1999.
- ADLERCREUTZ, H.; MAZUR, W. Phyto-strogens and western diseases. **Ann. Med.**, v. 29, p. 95-120, 1997.
- ANDERSON, J. J.; GARNERS, S. C. Phytoestrogens and human function. **Nutrition Today**, v. 32, p.232-239, 1997.
- ARAUJO, J. M. A.; SILVA, M. V.; CHAVES, J. B. P. Supercritical fluid extraction of daidzein and genistein isoflavones from soybean hypocotyl after hydrolysis with endogenous β-glucosidases. **Food Chemistry**, v. 105, p. 266-272, 2007.
- ROSTAGNO, M. A.; ARAUJO, J. M.A.; SANDI, D. Supercritical fluid extraction of isoflavones from soybean flour. **Food Chemistry**, v. 78, p. 111-117, 2002.
- ARAÚJO, J. M. A.; CARLOS, J. C. S.; SEDYAMA, C. S. Isoflavonas em grãos de soja: importância da atividade de betaglicosidase na formação do sabor amargo e adstringente. **Ciência e Tecn. Alimentos**, Campinas, v. 17, p. 137-141, 1997.
- BOERSMA, B. J.; BARNES, S.; KIRK, M. Soy isoflavonoids and cancer-metabolism at target site. **Mutation Research**, v. 480, p. 121-127, 2001.

CROMATOGRAFIA DE FASE GASOSA

Introdução

Cromatografia de fase gasosa consiste na separação de componentes vaporizados, combinando-se princípios de *partição*, *adsorção* e *volatilidade*. Os princípios de separação são os mesmos dos outros tipos de cromatografia, mas a mecânica pela qual essas separações ocorrem é diferente.

A *fase móvel* é um gás (hélio, hidrogênio ou nitrogênio), enquanto a *fase estacionária* é um líquido de alto ponto de ebulição que envolve o material sólido inerte. A *fase estacionária* é "empacotada" em uma coluna de metal ou de vidro, a qual é colocada dentro do forno do cromatógrafo, onde a temperatura é termostaticamente controlada.

As colunas são "empacotadas" com diferentes suportes sólidos inertes, os quais são recobertos com diferentes filmes orgânicos não-voláteis. O suporte preparado contendo a fase orgânica líquida constitui a *fase estacionária*. Com a passagem dos componentes volatilizados pela coluna ocorre a partição entre a *fase estacionária* e a *fase móvel* (gás). Pequena quantidade (microlitros) do solvente contendo os componentes dissolvidos é introduzida no injetor com o auxílio de microseringas.

A temperatura do bloco injetor deve ser suficientemente elevada para garantir completa vaporização dos componentes. Isso permite que estes sejam carreados pelo gás de arraste (N_2 , H_2 ou He) para a coluna, a qual é também mantida em temperatura elevada.

Os componentes vaporizados saem da coluna na ordem inversa de sua afinidade pela fase estacionária, ou seja, os componentes com alta afinidade pela fase estacionária são os últimos a deixar a coluna. As

serem eluídos, os componentes passam pelo *detector*, sendo detectados e registrados em gráficos.

Instrumentação Básica

A configuração básica (Figura 15.1) consiste dos seguintes componentes: (1) e (2) - gases para combustão no detector, (3) - gás carreador, (4) - tubulações, (5) - microseringa, (6) - septo, (7) - injetor, (8) - forno, (9) - coluna, (10) - detector, (11) - efluentes da coluna, (12) - cabos eletrônicos, (13) - amplificador, (14) - sistema computadorizado para coleta de dados e (15) - registrador.

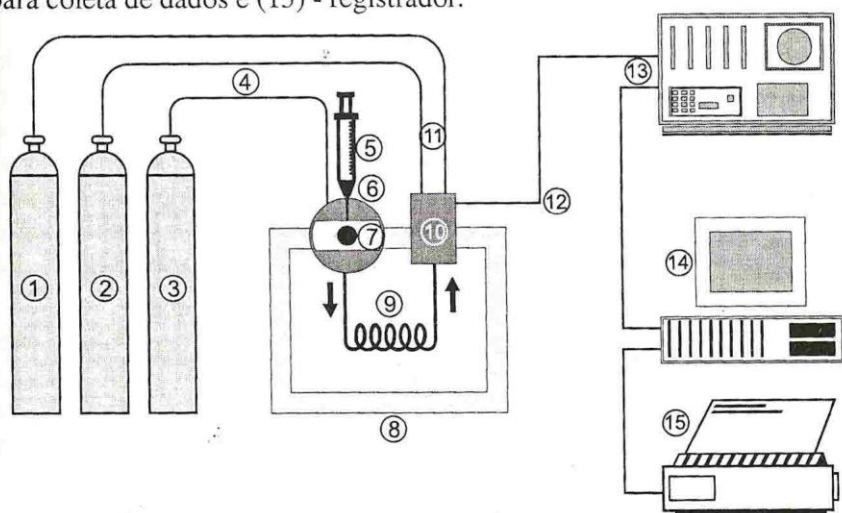


Figura 15.1 - Esquema do cromatógrafo a gás.

Mecanismo de Separação

O processo de separação envolve o mecanismo de *partição* entre a fase estacionária líquida e a fase gasosa. Além disso, como a fase móvel é um gás, a mistura de componentes da amostra tem de estar na forma de gás ou de líquido, com alta pressão de vapor. Nessa situação, os componentes da amostra são carregados através da coluna pela fase móvel.

A pressão de vapor pode ser definida como a tendência de as moléculas de uma amostra líquida escaparem da fase líquida e se tornarem gás. Se essa tendência é alta, a pressão de vapor é elevada (típica de líquidos não-polares e de baixo PM). Se, entretanto, essa tendência é fraca, então a pressão de vapor é baixa (típica de substâncias altamente polares e, ou, de alto PM). Exemplos de substâncias com alta pressão de vapor são éter, acetona e clorofórmio. Exemplos de substâncias de baixa pressão de vapor são água e álcoois de alto PM. A alta pressão de vapor está sempre relacionada com o baixo ponto de ebulição. Se moléculas das substâncias escapam rapidamente da fase líquida, significa que não necessitam de absorver muita energia para passar para a fase gasosa e vice-versa.

Em cromatografia de fase gasosa, substâncias com alta pressão de vapor são fortemente influenciadas pela fase móvel gasosa e saem rapidamente da coluna, se a solubilidade na fase estacionária é baixa. Por outro lado, se a pressão de vapor dos componentes da mistura é baixa, mas estes possuem alta solubilidade na fase estacionária, o tempo requerido para sair da coluna é elevado. A pressão de vapor varia substancialmente com a temperatura. Portanto, a temperatura elevada da coluna é comumente utilizada.

Os componentes da amostra movimentam-se na coluna em velocidades diferentes, dependendo, principalmente, do PM, da pressão de vapor e da afinidade pela fase estacionária. As frações emergem da coluna para o detector, onde produzem impulsos elétricos, registrados em cromatograma.

A amostra a ser analisada é aplicada, por meio de microseringas, no injetor (Figura 15.1), que é mantido a uma temperatura superior à da coluna, garantindo, assim, a completa vaporização da amostra. O gás (fase móvel), o qual passa através do sistema continuamente, carrega a amostra vaporizada através da coluna mantida sob aquecimento. Em razão de coeficientes de distribuição diferentes, os vários componentes da amostra injetada saem da coluna em tempos variados. Uma vez que os componentes da amostra tenham sido emitidos da coluna, o problema passa a ser de detecção.

O bloco do detector está situado no terminal da coluna (Figura 15.1), o qual é mantido também em altas temperaturas, evitando condensação da amostra em seu interior. As frações emergem da coluna

para o detector, produzindo impulsos elétricos, que são amplificados para o registrador.

Observação: Uma condição indispensável para análise em cromatografia gasosa é a completa vaporização da amostra. Caso esta, em seu estado natural, não se vaporize em temperatura do injetor, necessitará de ser derivatizada.

Compostos instáveis termicamente e de baixa volatilidade, como açúcar, aminoácidos, ácido graxo etc., precisam ser derivatizados. A derivatização é uma técnica em que a substância se torna volátil e termicamente estável, além de promover melhores separação e resolução dos componentes. Por esta técnica, praticamente toda substância conhecida pode ser analisada em cromatografia de fase gasosa.

Coluna e Fase Estacionária

As colunas usadas em cromatografia de fase gasosa podem ser *empacotadas* ou *capilares*. Nos últimos anos, as colunas empacotadas têm sido pouco utilizadas em razão das maiores vantagens das capilares.

Colunas empacotadas de aço inoxidável são as mais usadas, por serem de manuseio mais fácil e suportarem pequenas torções sem comprometer seu *empacotamento* e, conseqüentemente, sua resolução. A fase estacionária (líquido) é adsorvida pela superfície do substrato sólido (material granular de terra diatomácea), denominado suporte, e resiste a temperaturas acima de 450°C.

O suporte deve ser inerte, de granulometria com diâmetro entre 125 e 250 μm e de definido mesh (60/80, 80/100 ou 100/120 mesh). Estes suportes são geralmente de dois tipos: terra diatomácea (nome comercial: Chromosorb) e teflon. O material escolhido para ser utilizado como fase estacionária (líquido usado na cobertura do material inerte na proporção de 1,0 a 10,0% do peso do suporte sólido) determina, na maioria das vezes, a "performance" da coluna.

Colunas contendo maior quantidade de fase líquida retêm por mais tempo os compostos, mas promovem melhor separação. Dos mais de 200 tipos de líquido disponíveis no mercado, os mais comuns são à base de silicone (metil, fenil e carbowax). A escolha da fase líquida envolve intuição, conhecimento de química, informações do fabricante e

literatura. Como regra, a polaridade da fase estacionária deve ser similar à dos componentes da amostra a serem separados.

A fase estacionária é um filme (polímero) que reveste a parede interna da coluna capilar, retardando a movimentação dos componentes da amostra injetada ao longo da coluna. Diferenças nas propriedades químicas e físicas dos compostos orgânicos injetados e suas interações com a fase estacionária são a base do processo de separação.

A interação entre os componentes da amostra e a fase estacionária varia em função das propriedades das substâncias analisadas. Quando a energia da interação "substância-fase estacionária" difere significativamente para dois compostos, um é retido por mais tempo que o outro. O tempo em que são retidos na coluna (tempo de retenção) é a medida dessa interação.

A escolha da polaridade da fase estacionária é o parâmetro mais importante na seleção de uma coluna. A definição do tipo de fase é baseada no princípio geral de que "igual dissolve igual". Uma coluna não-polar é, portanto, utilizada em análises de compostos não-polares e vice-versa.

Os componentes não-polares são constituídos de átomos de carbono e hidrogênio contendo ligações simples entre os átomos de carbono (hidrocarbonetos). As interações entre os compostos não-polares e a fase não-polar são dispersivas, isto é, as moléculas entram e saem da fase ao acaso. Assim, a separação é baseada exclusivamente no ponto de ebulição.

Os compostos polares são também constituídos de átomos de carbono e hidrogênio, mas possuem um ou mais átomos de Br, Cl, F, N, O, P e S. Além das interações dispersivas, ocorrem também interações entre as moléculas polares e a fase polar, incluindo dipolo-dipolo e, ou, ácido-base. A separação é determinada pela diferença no efeito geral dessas interações.

Diferentes espessuras do filme (fase estacionária) são utilizadas em diversas situações. De modo geral, filmes mais espessos retêm os compostos por um tempo maior e requerem temperatura mais elevada para eluir os componentes e vice-versa. Em geral, filmes mais espessos são utilizados para componentes de baixo ponto de ebulição, permitindo maior interação com a fase estacionária e maior resolução entre os pares muito próximos.

As espessuras da fase estacionária utilizada podem ser assim divididas:

1 - Espessura entre 3,0 e 5 μm : utilizada em análises de gases, solventes etc.

2 - Espessura moderada entre 1,0 e 1,5 μm : empregada em análises de componentes que são eluídos em temperatura entre 100 e 200 °C.

3 - Espessura entre 0,25 e 0,5 μm : utilizada para eluir compostos em temperatura acima de 300 °C.

4 - Espessura do filme de 0,1 μm : ideal para compostos de alto peso molecular, eluídos em temperatura acima de 300 °C.

As colunas de sílica fundida são o último avanço na tecnologia de colunas para a cromatografia gasosa. Mais conhecidas como *colunas capilares*, em razão de seu diâmetro, estas colunas têm minimizadas a adsorção e a decomposição em sua superfície, o que possibilita a cromatografia de aminas, álcoois, fenóis, ácidos e outras substâncias polares, sem a necessidade de derivatização. Podem ser operadas em temperaturas de 10 a 20 °C superiores às suas correspondentes de aço e vidro. São extremamente flexíveis e grandes (cerca de 50 metros) e com diâmetro interno variável (Tabela 15.1).

Tabela 15.1 - Característica das colunas em cromatografia de fase gasosa

Parâmetros	Capilar	Empacotada
Posição da fase estacionária	Parede	Na resina
Diâmetro interno (mm)	0,1 - 0,5	2,0 - 4,0
Comprimento (m)	5,0 - 100	0,5 - 10,0
Espessura da fase líq. (μm)	0,3 - 2,0	1,0 - 10,0
Veloc. gás de arraste (ml/min)	1,0 - 2,0	20,0 - 80,0

O diâmetro interno (DI) das colunas capilares variam de 0,1 mm (microbore), 0,2 - 0,32 mm (capilar normal) a 0,53 mm (megabore). A fase líquida (Tabela 15.2), com espessura variando de 0,1 a 5,0 μm , é quimicamente ligada à parede interna do vidro. As colunas com DI de 0,20, 0,25 e 0,32 μm oferecem melhor resolução e menor capacidade de injeção da amostra.

Tabela 15.2 - Fase estacionária mais comum

Composição	Polaridade	Aplicação
100% dimetil polissiloxano (goma)	Não-polar	Fenóis, aminas, hidrocarbonetos, compost. sulfurados, pesticidas
100% dimetil polissiloxano (líquido)	Não-polar	Óleo essencial, AAs, derivados
5% difenil, 95% dimetil polissiloxano	Não-polar	Ác. graxo, éster metílico, alcalóides
7% cianopropil, 7% fenil polissiloxano	Intermediária	Esteróis, pesticida
50% fenil, 50% metil polissiloxano	Intermediária	Esteróis, glicóis, pesticida
50% cianopropil, 50% polimetil polissilo. metílico	Intermediária	Ác. graxo, éster
Polietileno glicol-TPA modificado	Polar	Ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas
Polietileno glicol	Polar	Ác. livres, álcoois, éster, óleo essencial

Injeção da Amostra

A injeção da amostra é a maior fonte de imprecisão em cromatografia gasosa. Seringas de 10,0 μl são as preferidas, e o volume injetado varia de 1,0 a 3,0 μl . Em torno de 0,6 μl da amostra é retida na agulha. Portanto, a quantidade da amostra injetada no cromatógrafo depende da habilidade do analista em obter a leitura correta do volume. Duas técnicas de injeção são as mais utilizadas em colunas capilares.

Split – É o tipo de injeção mais comum, com o qual se obtém redução na quantidade da amostra injetada na coluna capilar, em razão de sua pequena capacidade em relação à da empacotada. É utilizada para amostras concentradas (componentes variando de 0,1 a 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

A amostra, ao ser inserida no injetor aquecido, é imediatamente vaporizada numa área por onde passa o gás carreador em alta velocidade. Parte da mistura (amostra vaporizada mais gás carreador) é então transferida para a coluna capilar, sendo o restante ventilado para o meio ambiente. A diferença desse fluxo estabelece então a razão de divisão, conforme mostrado na equação a seguir.

$$\text{Razão de divisão} = \frac{\text{Fluxo da coluna} + \text{fluxo do divisor} + \text{fluxo da purga}}{\text{Fluxo da coluna}}$$

Na prática, utilizam-se o tipo convencional de seringa para injetar a amostra (1,0 a 2,0 μl) e a razão de divisão de 100:1.

Se a amostra possui componentes de PM muito variáveis, pequenas variações podem ocorrer na velocidade de vaporização. Os componentes de PM elevado requerem um tempo ligeiramente maior para serem vaporizados, portanto podem não estar totalmente vaporizados ao chegarem ao *split*. Outro ponto importante a ser considerado é com relação aos compostos termossensíveis, os quais podem ser degradados.

Splitless – É utilizado em análises de amostras diluídas (traços). A amostra é inserida no injetor aquecido, ocorrendo sua imediata vaporização. O gás carreador em baixo fluxo se mistura com a amostra vaporizada, carreando-a para a coluna.

A temperatura da coluna é mantida a 10-20°C abaixo do ponto de ebulição do solvente no qual a amostra se encontra dissolvida, de forma que o volatilizado, ao entrar na coluna, se condense. Após aproximadamente 1,5 a 2,0 volumes do gás carreador terem passado pelo injetor e pela coluna, a válvula de escape desse gás será aberta e qualquer resíduo remanescente no injetor será ventilado para a saída do divisor.

Após um período de tempo predeterminado, a temperatura da coluna é programada; com o aumento desta, inicia-se a eluição dos componentes da coluna. A injeção da amostra deve ser feita lentamente, em razão da capacidade limitada do injetor, evitando seu retorno.

Teoria em Cromatografia

Cromatografia é um processo contínuo, mas, para efeito de melhor compreensão, imagina-se que a coluna é dividida em segmentos de determinado tamanho. Em cada segmento ocorre um equilíbrio (destilação) entre a fase estacionária e a fase móvel, com a passagem do soluto pela coluna.

O composto "destila" da fase estacionária para a fase móvel, e, quanto mais ele se destila, melhor sua separação dos outros componentes. Uma destilação é denominada "prato teórico".

Terminologia utilizada para descrever a eficiência da coluna

N: Pratos teóricos – referem-se a um único estágio no processo de separação, o qual envolve grande número de estádios para se obter uma boa separação. Fazendo analogia com o processo de destilação, um único estágio consiste na condensação de vapores, seguida pela evaporação.

Cada estágio de condensação e evaporação resulta no enriquecimento de um componente da mistura. Portanto, grande número de tais estágios (pratos teóricos) resulta em significativa purificação.

Em cromatografia de partição, este estágio, denominado único, se refere à dissolução dos componentes na fase estacionária, seguida da dissolução destes na fase móvel; quanto mais vezes isso ocorrer, melhor será a separação. Portanto, a obtenção de uma boa separação depende do número de pratos teóricos.

O número de pratos teóricos pode ser calculado medindo-se a abertura do pico em função do tempo de retenção (Figura 15.2).

$$N = 16 (t_R/W)^2 \text{ ou } N = 5,54 (t_R/b)^2$$

sendo: N = pratos teóricos; t_R = tempo de retenção do pico; e W = largura do pico medida na linha de base ou na metade da altura do pico (b).

Valores elevados para N são desejáveis para uma boa separação. Tempo de retenção é o tempo em que o soluto é retido na coluna após a injeção (antes de ser eluído). O termo N pode ser também utilizado para indicar deterioração da coluna.

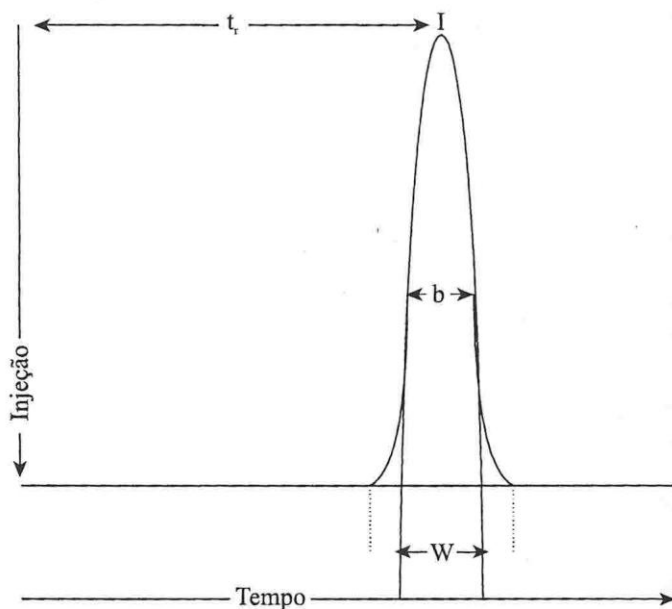


Figura 15.2 – Determinação do número de pratos teóricos.

Hetp

É o tamanho da coluna equivalente a um prato teórico. Os picos alargam-se ao saírem da coluna, o que é indesejável, causando picos de base aberta e com separação da linha de base muito ruim. HETP é a medida dessa distorção e, quanto menor o seu valor, melhor a eficiência da separação. Colunas com valores de HETP variando de 0,3-1,0 mm são consideradas excelentes. O HETP é a medida preferida da eficiência da coluna, permitindo comparações entre colunas de diferentes tamanhos.

Os valores de *HETP* e *N* relacionam-se da seguinte forma: $HETP = L/N$, em que *L* é o tamanho da coluna, em mm ou cm, sendo também proporcional ao tamanho da coluna.

Resolução

É definida como a distância (*d*) entre o centro de dois picos consecutivos dividida pela média da largura (*w*) de suas bases. Se *R* = 1,0, a resolução de dois picos de áreas idênticas está 98% completa; se *R* = 1,5, a separação está 99,7% completa (Figura 15.3).

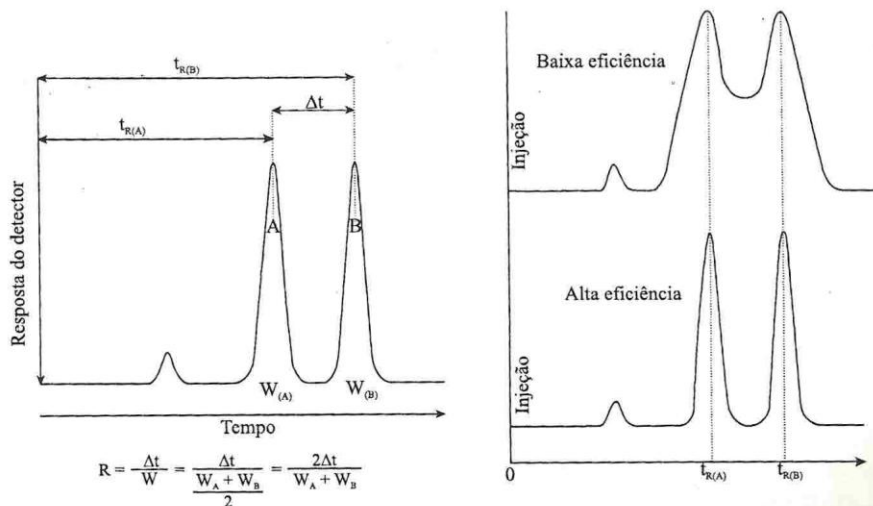


Figura 15.3 - Eficiência de uma coluna.

Fatores que afetam a resolução

Temperatura da coluna: Aumentando a temperatura da coluna, aumenta também a pressão de vapor dos componentes da amostra, reduzindo o tempo de retenção.

O aumento da temperatura, entretanto, provoca efeito variável na pressão de vapor de diferentes substâncias, ou seja, a pressão de vapor de duas substâncias quaisquer não aumenta igualmente com a temperatura. De forma similar, a pressão de vapor reduz com a diminuição da temperatura (aumenta o tempo de retenção), mas em diferentes níveis para diversas substâncias. Portanto, tanto a diminuição quanto o aumento da temperatura podem ser utilizados para alterar o tempo de retenção e melhorar a resolução.

Tamanho da coluna: Como mencionado anteriormente, colunas acima de 10,0 m (colunas empacotadas) não são utilizadas. Isso se deve à necessidade de uma alta pressão para sustentar o fluxo de gás. Mais recentemente, com novas tecnologias, foi desenvolvida a coluna capilar. Esta consiste – em vez de partículas sólidas contendo a fase líquida dentro da coluna, como no caso das colunas empacotadas – de uma fase estacionária adsorvida na parede interna de um tubo capilar de diâmetro muito pequeno (0,1 - 0,7 mm), de forma que o tubo permanece aberto para a passagem do gás (Figura 15.4).

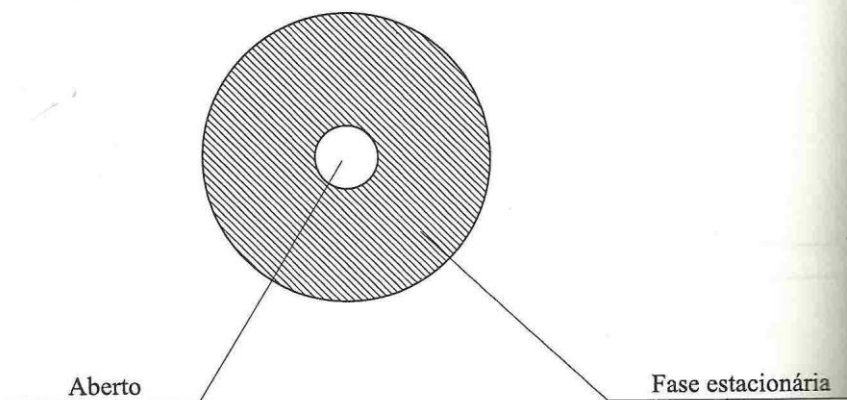


Figura 15.4 - Vista de uma coluna capilar.

Colunas de 30 metros são as mais utilizadas, e as de 15 metros são usadas para testes rápidos de mistura simples ou para compostos de elevado peso molecular. Colunas acima de 30 metros são utilizadas para amostras complexas, a fim de se obter o máximo em resolução. Entretanto, existe um limite prático para se aumentar o tamanho da coluna. *Por exemplo, em análises isotérmicas, uma coluna de 60 metros aumenta a resolução em 40% em relação à de 30 metros ($R = K\sqrt{L}$).*

Fluxo de gás: A velocidade do gás carreador afeta a resolução. Os componentes da mistura se dispersam mais rapidamente dentro da coluna (independentemente do grau de interação com a fase estacionária) se a velocidade do gás é aumentada. Portanto, um fluxo mínimo é necessário para se obter uma boa resolução.

Para fluxo de gás muito baixo, a resolução é menor, em razão de fatores como irregularidade no empacotamento, tamanho das partículas, diâmetros da coluna etc. Os fluxos recomendados encontram-se descritos na Tabela 15.1.

Volume da amostra injetada: Um volume da amostra muito grande não pode ser adequadamente retido por uma coluna de diâmetro pequeno. Como resultado, obtêm-se picos largos, reduzindo a chance de uma completa resolução dos componentes da mistura. Os volumes recomendados variam com o diâmetro da coluna. Para colunas capilares, recomenda-se volume máximo de 1,0 μl e, para as empacotadas, de até 20 μl .

Natureza da fase estacionária: A interação dos componentes da mistura ocorre com a fase estacionária, portanto a sua natureza é obviamente importante. Centenas de diferentes líquidos utilizados como fase estacionária estão disponíveis, mas somente alguns deles são comumente utilizados. O procedimento usual para selecionar a fase estacionária é baseado em informações obtidas em literaturas e do fabricante.

Aumentando a espessura do filme, geralmente se reduz a eficiência da coluna e aumenta o tempo de retenção. Em geral, colunas de 0,10 - 0,25 μm são utilizadas para separar substâncias de alto ponto de ebulição ($> 300^\circ\text{C}$).

Sensibilidade

É o quociente entre o tamanho do pico e a linha de base (ruído). Para determinado pico ser detectado e quantificado, sua altura tem de ser no mínimo duas vezes a intensidade do ruído da linha de base.

Detectores

Os detectores mais utilizados em cromatografia de fase gasosa são Condutividade Térmica (CT), Ionização de Chama (IC) e Captura de Elétrons (CE). As frações, ao saírem da coluna, passam pelo detector, que é mantido em uma temperatura mais alta que a da coluna para evitar a condensação da amostra. Os detectores para CG detectam gases e não líquidos, transmitindo impulsos elétricos, que são amplificados e registrados em gráficos.

- Detector de condutividade térmica (DCT)

Responde a todos os componentes de uma amostra não idêntica à do gás carreador. Baseia-se no fato de que o gás, contendo os componentes separados, mudará a temperatura do fio metálico (tungstênio), diferentemente do gás por si só. A mudança de resistência à corrente elétrica resultante da variação de temperatura é medida pelo circuito, por meio da ponte de Wheatstone, que alimenta o registrador. Após a saída da substância, a temperatura do fio de tungstênio e a do gás são idênticas. Este tipo de detector não destrói a amostra.

- Detector de ionização de chama (DIC)

Compostos orgânicos eluídos da coluna são ionizados pela passagem através da chama de hidrogênio (isto é, o detector requer alimentação contínua de H_2 e ar para manter a chama acesa – 2.000 °C), e os íons produzidos são utilizados para conduzir corrente elétrica, os quais são amplificados e transmitidos para o registrador. O detector de ionização de chama baseia-se no princípio de que a condutividade elétrica de um gás é diretamente proporcional à concentração de partículas carregadas, como íons (positivos ou negativos) e elétrons.

O efluente da coluna é misturado com H_2 e O_2 e queimado. Como numa chama de $H_2 + O_2$ não existem íons, ela não conduz corrente elétrica. Quando um composto orgânico elui, ele também é queimado. Como na sua queima são formados íons, a chama passa a conduzir corrente elétrica (Figura 15.5).

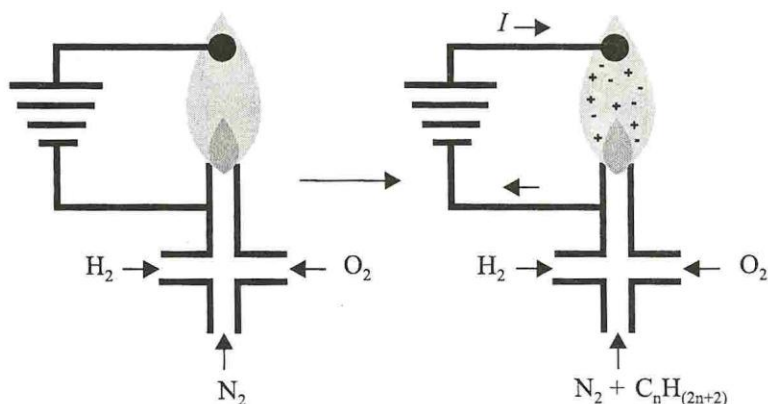


Figura 15.5 - Detector por ionização em chama.

- Detector de captura de elétrons (DCE)

Mede a perda de sinais em vez da corrente elétrica produzida. O gás carreador passa pelo detector, e a fonte de trítio ou $Ni63$ ioniza as moléculas de nitrogênio, formando elétrons. Estes migram para o anodo – que contém voltagem fixa –, onde são coletados. Se a amostra contém moléculas capazes de absorver os elétrons (grupos polares, halogênios), provoca redução da voltagem. Uma vez que os componentes da mistura tenham sido separados e o cromatograma tenha sido obtido, a próxima fase são a identificação e a quantificação dos componentes.

Identificação e Quantificação dos Picos

Os componentes eluídos da coluna são detectados pelo detector, e o sinal é enviado ao processador de dados, obtendo-se o cromatograma (Figura 15.6).

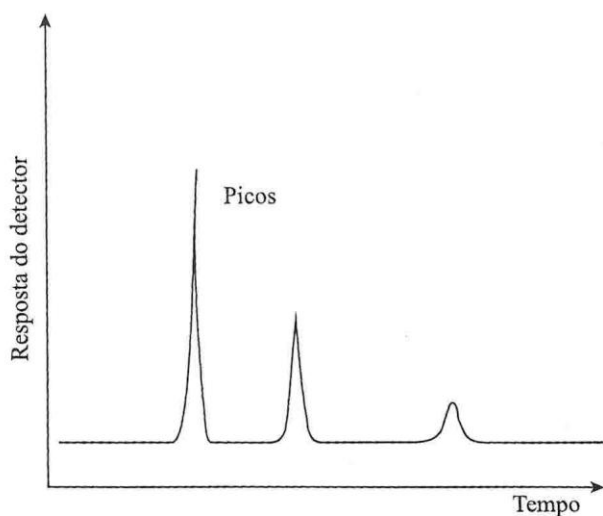


Figura 15.6 - Cromatograma típico.

Interpretação do cromatograma

É necessária uma positiva identificação pelo uso de padrões, os quais são injetados sob as mesmas condições, para se determinar o *tempo de retenção*, e devem ser iguais aos componentes da amostra que está sendo analisada; tempo de retenção igual somente é possível em condições idênticas (temperatura, velocidade do gás, coluna etc.).

Um termo mais adequado seria *tempo de retenção relativo*, no qual o tempo de retenção de todos os componentes é expresso como o quociente do tempo de retenção de um componente em relação ao padrão, observados a temperatura, a velocidade do gás e o tipo de coluna. Para se obterem informações quantitativas, como porcentagem de um componente, é necessário conhecer a área de cada pico.

Análise qualitativa

A partir do momento em que a substância é injetada e emerge da coluna e passa pelo detector, o tempo é registrado e denominado tempo de retenção daquela substância. Obviamente, se uma boa separação dos componentes foi obtida, então cada componente terá o seu tempo de retenção característico. Portanto, o tempo de retenção do pico é utilizado

na determinação qualitativa, comparando-o com aquele da amostra-padrão (Figura 15.7).

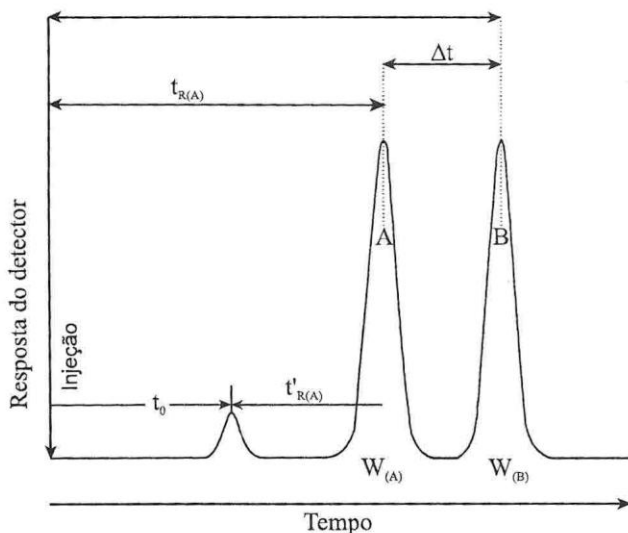


Figura 15.7 - Determinação do tempo de retenção.

O tempo de retenção é propriedade característica de determinado composto para uma coluna específica em condições padronizadas: *fluxo, temperatura, pressão e fases líquida e móvel*. Quando tais condições experimentais são controladas, o tempo de retenção é reproduzível e pode ser utilizado para identificar os componentes da amostra.

Análise quantitativa

Assumindo que uma boa separação e identificação dos componentes da amostra tenham sido obtidas e que a quantificação envolve a medição da altura do pico, área ou massa, devem-se comparar esses dados obtidos com o padrão de concentração conhecido.

- Método do fator de resposta

Considera-se uma mistura de quatro componentes a ser analisada. O cromatograma obtido é mostrado na Figura 15.8.

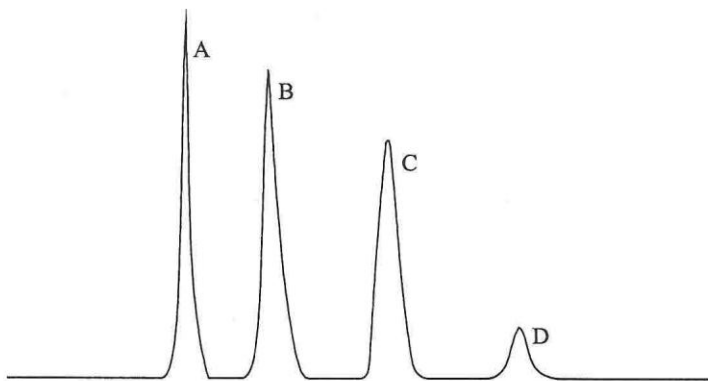


Figura 15.8 - Cromatograma de quatro componentes.

As áreas dos componentes de uma mistura não são diretamente proporcionais à sua composição percentual, ou seja, o detector não responde igualmente por todos os componentes, portanto é necessário determinar os fatores de correção. Uma vez determinados, esses fatores podem ser utilizados no cálculo da composição percentual.

Para quantificar, por exemplo, o componente B, mede-se a área dos quatro picos e divide-se a área correspondente ao pico B pela área total:

$$\%B = \frac{\text{Área do pico (B)}}{\text{Área(A)} + \text{Área(B)} + \text{Área(C)} + \text{Área(D)}} \times 100$$

A utilização desse procedimento implica que:

- Sem comparar o pico com o padrão, não se sabe se o resultado é expresso em % peso, % volume ou % mole.

- O detector não responde igualmente para todos os componentes. Portanto, para uma mesma concentração dos componentes, as áreas dos picos podem não ser idênticas. Dessa maneira, a soma das quatro áreas seria incorreta e a área do pico B não representaria a fração correta do total.

No entanto, é possível medir o *fator de resposta* para determinada substância, o qual é a área obtida pela unidade injetada – microlitro (μL) ou micrograma (μg).

O procedimento é injetar uma quantidade conhecida da substância (μL) ou pesar a seringa antes e depois da injeção. A área obtida resultante é medida e dividida por essa quantidade:

$$\text{Fator de resposta} = \frac{\text{área do pico}}{\text{quantidade injetada (padrão)}}$$

A quantidade da substância presente na amostra desconhecida é então determinada, medindo-se a área do pico da substância resultante da injeção de uma quantidade conhecida da amostra e dividindo-a pelo fator de resposta da substância.

$$\text{Quantidade da substância} = \frac{\text{área do pico}}{\text{fator de resposta}}$$

A porcentagem da substância pode, então, ser calculada:

$$\% \text{ Substância} = \frac{\text{quantidade da substância (acima)}}{\text{quantidade injetada}} \times 100$$

- Utilização de padrão

Externo: Soluções-padrão cobrindo a faixa de concentração desejada são cromatografadas, e os dados obtidos (altura do pico, área ou massa), utilizados na obtenção da curva-padrão. Um volume idêntico da amostra é então cromatografado, sendo os dados obtidos (altura do pico, área ou massa do pico da amostra) utilizados na determinação da concentração da amostra via curva-padrão (Figura 15.9).

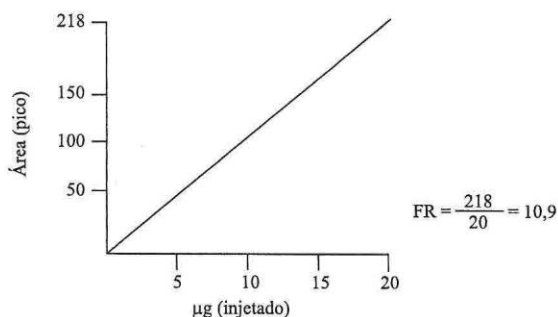


Figura 15.9 - Curva de calibração.

- Para uma amostra desconhecida, a quantidade do componente (y) de interesse será:

$$\mu\text{g}(y) = \frac{S_y}{FR} = \frac{S_y}{10,9} \quad S_y: \text{área do pico } y$$

- A concentração de (y) na amostra original será, então:

$$\mu\text{g}(y) \text{ encontrado} \times \frac{\text{vol. total da amostra (ml)}}{\text{vol. amostra injetada (ml)}} = \frac{\% P(y)}{\text{Peso da amostra original (g)}} \times 10^{-4}$$

Exemplificando: Foi injetado 1,0 μl da amostra e encontrado 0,1 μg de (y). Se a amostra original continha 0,25 g dissolvido em 25 ml do solvente, então:

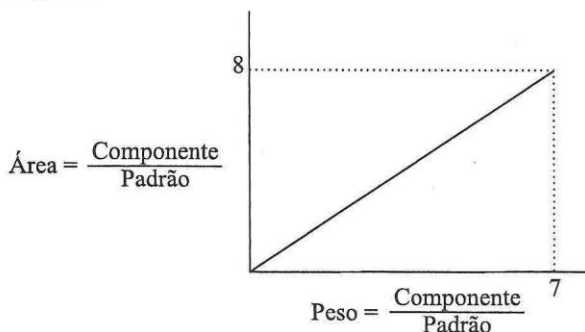
$$\% P(y) = \frac{0,1 \times (25/0,001) \times 10^{-4}}{0,25} = 1,0$$

Para obtenção de melhores resultados quantitativos, deve-se manter o volume da amostra constante e fazer diluições. Esse procedimento exige que o volume injetado seja cuidadosamente controlado. Técnicas de injeção da amostra são difíceis de serem reproduzidas, e esse tipo de erro é inerente ao método. A vantagem desse procedimento, em comparação com o fator de resposta, é que somente um pico é medido e todos os outros não precisam estar devidamente separados.

Interno: Escolher um composto que não esteja sendo analisado para utilizá-lo como referência. Esse composto deve apresentar propriedades químicas similares às do componente a ser analisado e ser eluído em uma área do cromatograma onde não interfira com os outros componentes. Neste procedimento, aos padrões e à amostra é adicionada uma quantidade conhecida de uma substância denominada padrão interno. O propósito desse padrão é servir como ponto de referência para as medições das áreas dos picos. Ligeiras variações no volume injetado são compensadas pelo fato de que tanto o pico do padrão interno como o da substância são afetados igualmente.

Mede-se a área do padrão interno e da substância e, assim, divide-se a área da substância pela área do padrão interno. O quociente obtido é então utilizado para se montar o gráfico (quociente x concentração).

- Exemplificando: Em uma amostra de 5,0 ml foram adicionados 5,0 ml de uma solução-padrão contendo $100 \mu\text{g/ml}$. Após cromatografada a mistura, o quociente da área obtido foi 8, portanto o quociente para o peso correspondente é 7 (figura a seguir). Conhecendo a concentração do padrão, então a concentração do componente é $7 \times 100 \mu\text{g/ml}$. Como foram adicionados 5,0 ml da solução-padrão, a quantidade total da substância desconhecida será: $5,0 \text{ ml} \times 700 \mu\text{g/ml} = 3.500 \mu\text{g}$ ou 3,5 mg na amostra original.



Método da adição do padrão: A amostra é inicialmente submetida à análise cromatográfica, sendo a área do pico (S_y) de interesse medida (Figura 15.10). Uma quantidade conhecida (P_y) da substância (y) a ser determinada é então adicionada à amostra e novamente submetida à análise cromatográfica. A área do novo pico ($S'y$) resultante é medida. O fator de calibração F_c para a substância (y) pode então ser determinado. Assim:

$$F_c = \frac{S'_y - S_y}{P_y}$$

A quantidade de Y na amostra original (antes da adição da quantidade P_y de Y) é então S_y/F_c . Graficamente (Figura 15.10), toma-se a área do pico x concentração adicionada e determina-se, por extrapolação, a quantidade da substância desconhecida.

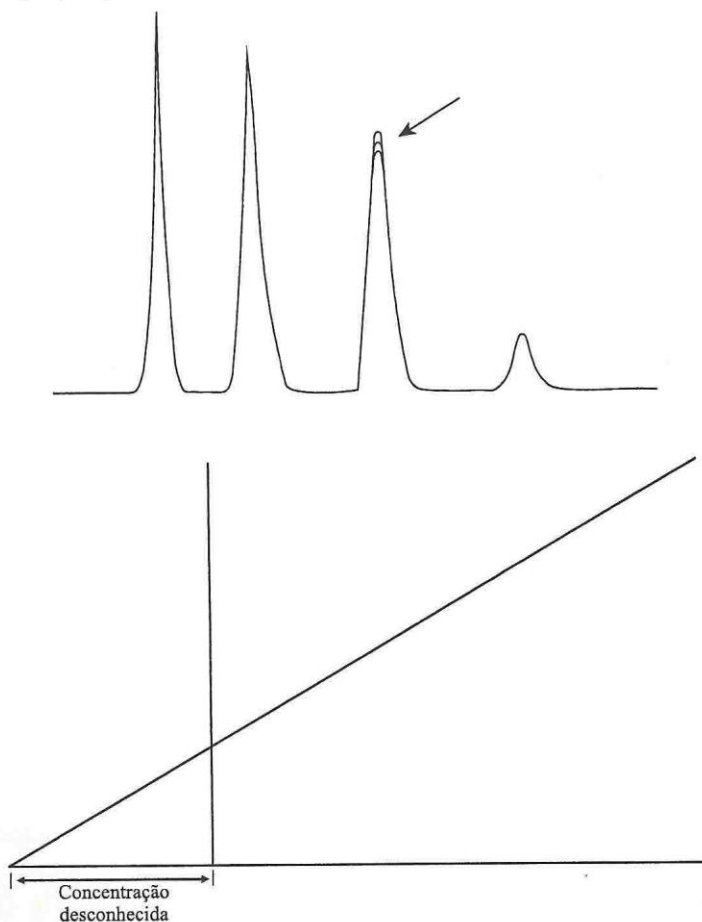
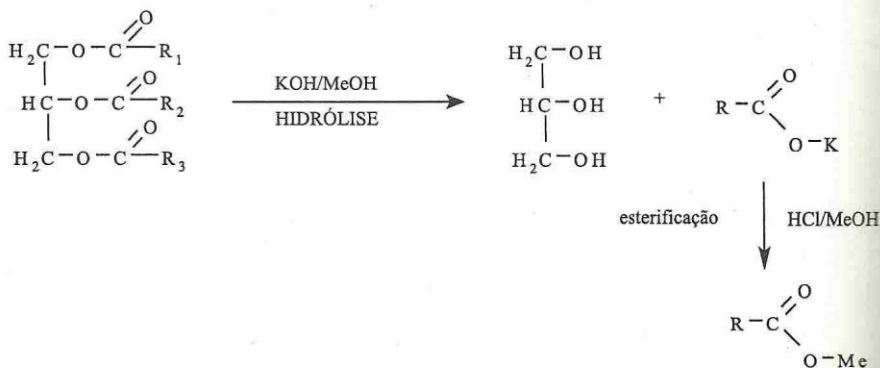


Figura 15.10 - Cromatograma ilustrando o método de adição do padrão.

2 - Esterificação: à mistura hidrolisada adicionar 400 μ l da solução HCl/MeOH (4:1 v/v) e aquecer novamente a 100 °C, durante 15 min (eq. 15.1).

eq. 15.1



Após o resfriamento, 2,0 ml de água são adicionados à mistura, e os ácidos graxos esterificados, extraídos com éter de petróleo (2 x 3 ml). A fase orgânica é passada em funil contendo Na_2SO_4 anidro, evaporada e redissolvida em 500 μ l de CHCl_3 .

3 - Aparelhagem e condições de uso:

Cromatógrafo a gás – detecção por ionização de chama.

Coluna: Omegawax (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m).

- Sistema isocrático de temperatura:

Tc = 200 °C, Ti = 220 °C e Td = 260 °C.

4 - Cromatografar os padrões de ácidos graxos e, a partir dos tempos de retenção (Tr), identificar os ácidos graxos da amostra.

Determinação de Etanol em Vinho

Procedimento

- Preparar solução-padrão de etanol em água (5, 10, 15, 20, 25 e 30%). Utilizar frasco volumétrico de 25 ml e, acuradamente, pipetar o etanol.

1 - *Aparelhagem e condições de uso:*

Cromatógrafo a gás – detecção por ionização de chama.

Coluna: Carbowax 20M (25 m x 0,2 mm x 0,2 μ m).

- *Sistema isocrático de temperatura:*

Tc = 60 °C, Ti = 150 °C e Td = 250 °C.

- *Sistema gradiente de temperatura:*

Tc = 60 °C/2 min, gradiente de 5 °C/min até 170 °C/1 min.

2 - Obter os cromatogramas dos padrões e da(s) amostra(s).

- Montar o gráfico, utilizando as áreas dos picos do etanol x concentração do etanol; obter graficamente a porcentagem de etanol da(s) amostra(s).

Identificação e Quantificação de Álcoois Superiores em Aguardente de Cana

Procedimento

- Preparar 10,0 ml de uma mistura de álcoois (solução-padrão) contendo 2,6 mg de n-propanol, isobutanol e isoamílico e 2,0 mg de pentanol (padrão interno) em etanol 43% v/v.

- Preparar a amostra, adicionando 1,0 ml de uma solução 0,2% (p/v) de 2-pentanol em EtOH 43% (v/v) a 9,0 ml de aguardente.

1 - *Aparelhagem e condições de uso:*

Cromatógrafo a gás – detecção por ionização de chama.

Coluna: Carbowax 20M (25m x 0,2 mm x 0,2 μ m).

- *Sistema isocrático de temperatura:*

Tc = 60 °C, Ti = 130 °C e Td = 150 °C.

2 - Obter os cromatogramas da solução-padrão e da amostra contendo o padrão interno.

3 - Identificar os álcoois superiores na amostra.

4 - Obter as áreas dos picos correspondentes aos álcoois e a do padrão interno. Utilizar a área de um dos picos do cromatograma da solução-padrão e a área do padrão interno para determinar a constante K, conforme equação a seguir:

$$KC = Ax/A_{pi}$$

sendo

Ax = área do composto em que se deseja determinar a concentração da amostra;

A_{pi} = área do padrão interno; e

C = concentração do composto de interesse na solução-padrão (mg/ml).

5 - Utilizar o cromatograma da amostra para o cálculo da Ax e A_{pi} e da concentração de cada um dos álcoois superiores da amostra analisada (mg/100 ml).

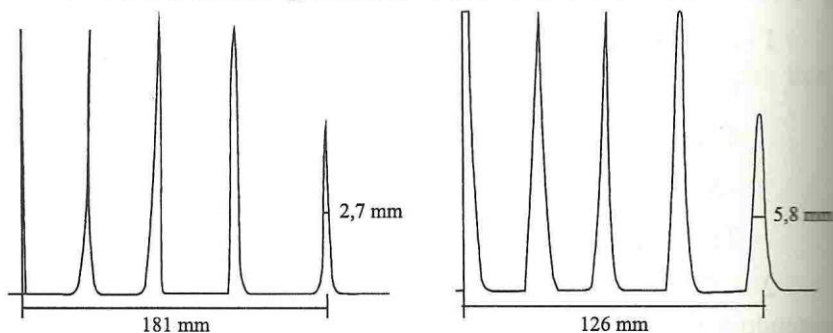
EXERCÍCIOS

1 - Por que o injetor em cromatografia gasosa deve ser aquecido em temperatura mais alta que a do forno?

2 - Listar três maneiras de aumentar o número de pratos teóricos em cromatografia gasosa.

3 - Em cromatografia gasosa, o mecanismo de separação é a partição. Certo ou errado? Explique.

4 - Dado o cromatograma abaixo, calcular a eficiência das colunas.



5 - Por que é necessário converter o triglicerídio em ácidos graxos metilados para análise em cromatografia gasosa?

6 - O que aconteceu com o glicerol na análise de ácidos graxos, ou seja, por que não foi observado no cromatograma?

7 - Aumentando o comprimento da coluna de 20 para 30 m, quanto resultaria em aumento no poder de resolução da coluna, considerando a mesma fase estacionária?

8 - Predizer a ordem de saída da coluna em CG, da seguinte mistura de ácido graxo: mirístico/esteárico/palmítico/oléico/palmitoléico/linoléico/araquídico/linolênico.

9 - A análise da fosfatidilcolina (lecitina) por CG em amostras tratadas com (1) fosfolipase A2 e (2) saponificação forneceu os seguintes resultados:

	Fosfolipase A2	Saponificação
Tempo de retenção	Concentração relativa	Concentração relativa
2,0 min	4,3	0,7
3,7 min	2,1	0,3
5,2 min	14,7	32,8
5,6 min	3,7	3,0
6,6 min	8,2	14,8
6,9 min	42,5	30,2
7,2 min	24,5	18,2

a) Diferenciar a ação da fosfolipase A2 (Capítulo 1) da saponificação.

b) Pelos resultados obtidos da ação da fosfolipase A2, é possível prever qual ácido graxo estará localizado na posição C2?

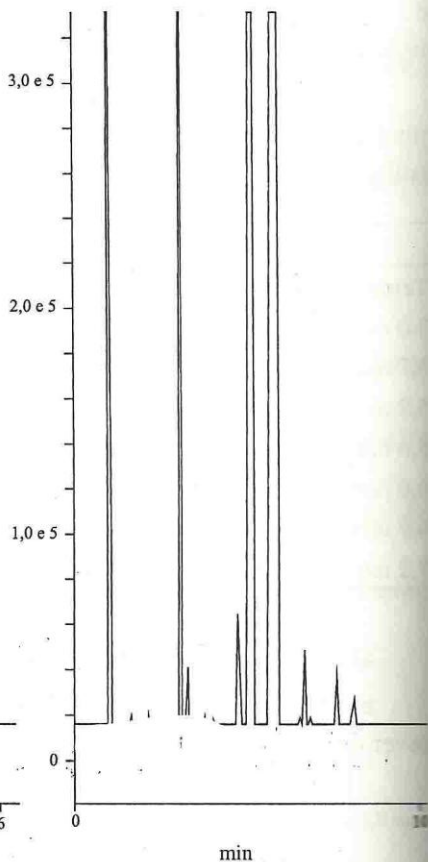
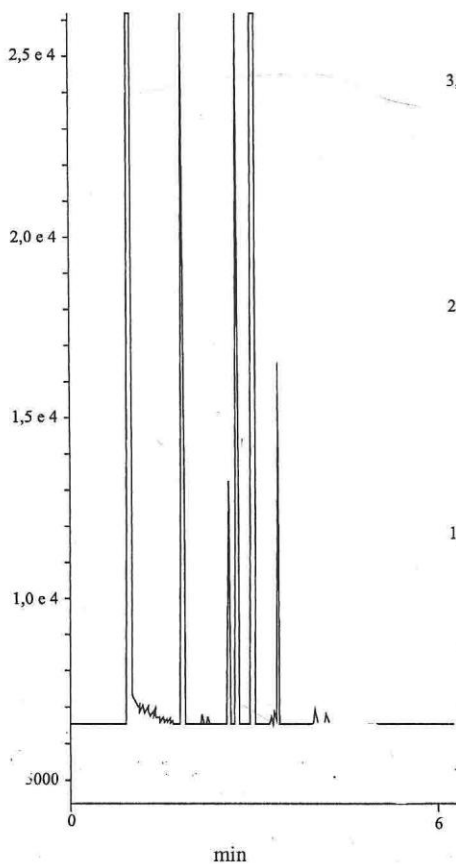
10 – Identificar, nos cromatogramas a seguir, os ácidos graxos e a origem do óleo/gordura (soja, azeite, milho e banha de porco).

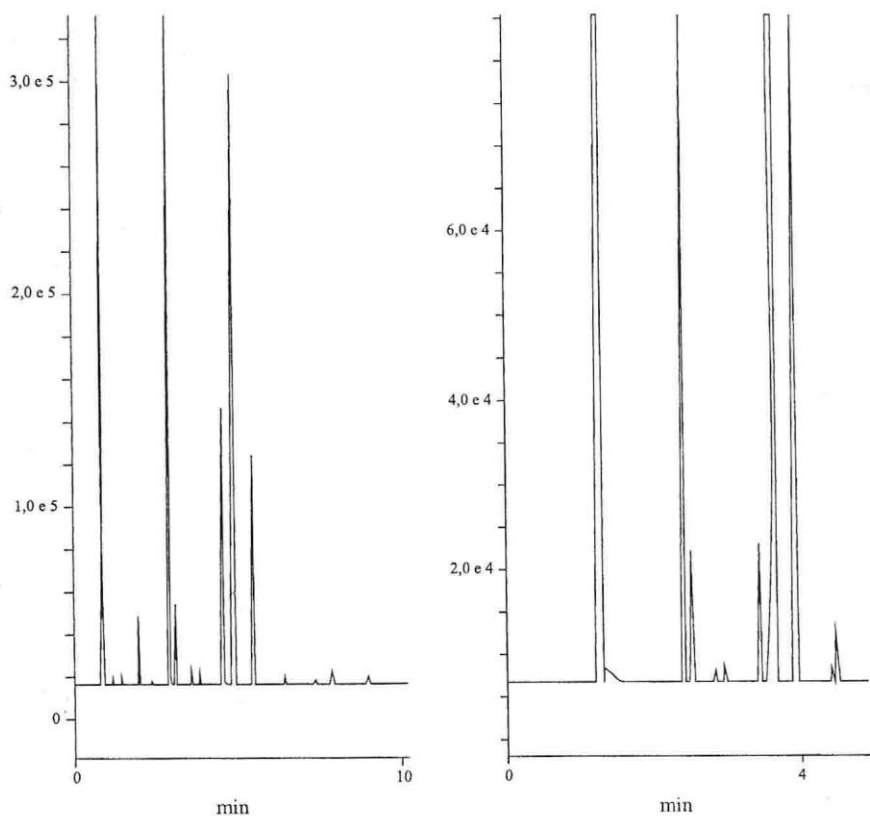
Aparelhagem e condições de uso:

- Cromatógrafo a gás – detecção por ionização de chama.
- Coluna: PAG (polialquilenoglicol) 25 m x 0,2 mm x 0,2 μ m.

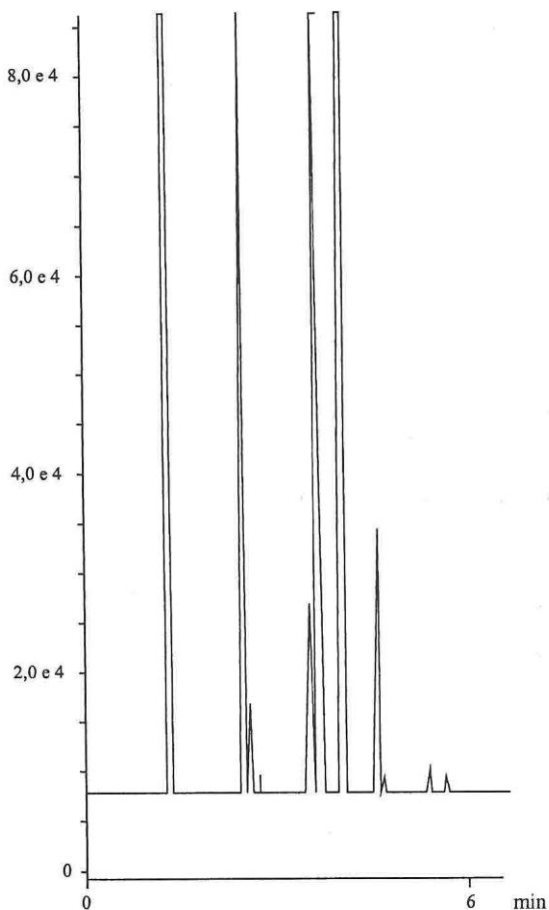
Sistema isocrático de temperatura:

Tc = 200 °C, Ti = 230 °C e Td = 260 °C.





11 - O cromatograma a seguir, representa a mistura de óleo de soja e azeite de oliva. Identificar, conforme este cromatograma os ácidos graxos e a porcentagem de soja na mistura.



Pk#	Tempo de retenção	Área	Largura	Área %
1	1.271	2.838.088	0,015	56.6662
2	1.311	47.651	0,024	0.9514
3	2.469	266.756	0,029	5.3261
4	2.577	19.127	0,031	0.3819
5	3.511	63.810	0,053	1.2741
6	3.707	1.011.367	0,044	20.1933
7	4.055	695.300	0,042	13.8826
8	4.583	66.330	0,039	1.3244

Área total = 5.008.429

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO

Introdução

A cromatografia líquida de alto desempenho (CLAD) pode ser utilizada na análise de qualquer substância solúvel no solvente utilizado como fase móvel.

Todas as formas de cromatografia podem ser definidas como um processo de migração, em que os componentes da amostra são seletivamente retidos pela fase estacionária. Esta fase pode ser de material sólido ativo ou líquido imobilizado.

Comparativamente, existem diversas similaridades entre a configuração do CLAD e a do cromatógrafo a gás (CG):

- A fase estacionária consiste em pequenas partículas sólidas “empacotadas” dentro de um tubo denominado coluna.
- O injetor é posicionado no topo da coluna, através do qual a amostra é introduzida na fase móvel.
- O sistema de detecção, localizado na saída da coluna, gera sinal elétrico quando qualquer componente diferente da fase móvel é eluído.
- Os sinais eletrônicos gerados pelo detector são enviados ao registrador e convertidos em gráficos.

Como a fase móvel é um líquido, existem, portanto, diferenças óbvias entre as duas configurações:

1 - O mecanismo de separação em CLAD envolve a interação dos componentes da mistura com a fase móvel, enquanto em CG a pressão de vapor dos componentes, e não a interação com o gás carreador, é o fator mais importante.

2 - A força que sustenta o fluxo da fase móvel é proveniente de uma bomba de alta pressão, em vez da pressão regulada do gás comprimido no cilindro.

3 - O sistema de injeção (injetor) é especial, por causa da sua alta pressão.

4 - O detector também é especial em razão da fase móvel líquida. Finalmente, o injetor, a coluna e o detector não necessitam de aquecimento como em CG, embora o modo de separação na coluna possa ser afetado pela temperatura; às vezes, temperaturas elevadas são utilizadas.

Diferentemente da cromatografia a gás (Quadro 16.1), os compostos para análise não necessitam ser voláteis, mas é necessário que sejam solúveis na fase móvel.

Quadro 16.1 - Comparação entre CG e CLAD

Parâmetros	CG	CLAD
Fase móvel	Gás inerte	Líquida
Fase estacionária	Líquida ou sólida	Líquida ou sólida
Tamanho da coluna	1,0 - 100,0 m	< 30,0 cm
Fase do composto:		
- Injetado	Gás ou líquido	Líquido
- Detectado	Gás	Líquido
Temperatura da coluna	100 - 300 °C	Ambiente - 65 °C
Detectores	———— Diferentes ————	
Identificação de picos	Tempo de retenção	Tempo de retenção
Quantificação	———— Igual ————	
Descrição matemática:		
(N, HETP, Resolução)	———— Igual ————	

Instrumentação Básica

A configuração básica (Figura 16.1) consiste nos seguintes componentes: (1) - reservatório para solventes, (2) - suporte, (3) - tubos de teflon, (4) - bomba de alta pressão, (5) - misturador de solventes, (6) - injetor, (7) microseringas, (8) - *loop*, (9) - tubos de aço inox, (10) - coluna, (11) - detectores, (12) - coletor de solvente, (13) - cabos eletrônicos, (14) - registrador e (15) - sistema computadorizado de coleta de dados.

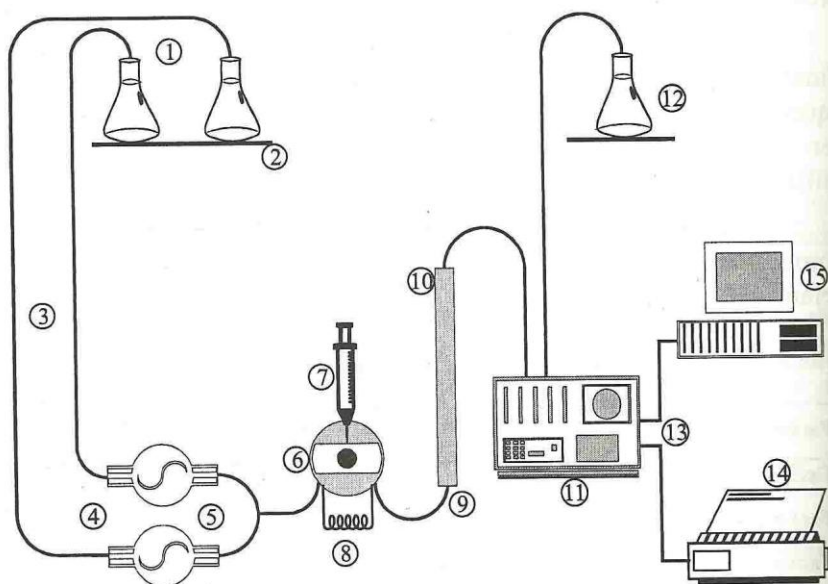


Figura 16.1 - Esquema do cromatógrafo líquido.

Coluna e Fase Estacionária

As colunas geralmente utilizadas em cromatografia líquida são de aço inoxidável, com tamanho variável de 10-30 cm de comprimento e 3,0 a 10,0 mm de diâmetro. Alta pressão é necessário, em razão do pequeno tamanho da partícula de sílica ou resinas (3,0 - 10,0 μm de diâmetro) e da viscosidade da fase móvel.

A sílica é o material mais utilizado no empacotamento da coluna. Consiste principalmente em dióxido de silício (SiO_2), com o átomo de silício no centro do tetraedron. A valência remanescente na superfície é ocupada pela hidroxila ($-\text{OH}$).

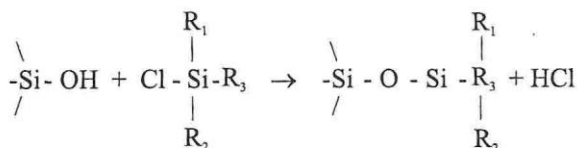
1 - Sílica porosa: Pode ser preparada com partículas de diversos tamanhos e poros de diversos diâmetros. Ambos, tamanho da partícula e diâmetro dos poros, são parâmetros importantes na separação cromatográfica. Partículas menores reduzem a distância de contato do soluto com as fases estacionária e móvel, facilitando o equilíbrio e, conseqüentemente, a melhor eficiência da coluna. Entretanto, partículas menores aumentam a resistência à velocidade do fluxo (fase móvel). Para colunas analíticas, partículas de 3,0, 5,0 e 10,0 μm são utilizadas.

Poros de diâmetros menores maximizam a área superficial e, portanto, a capacidade da amostra (quantidade de amostra que pode ser separada). Diâmetros de 50,0 a 100,0 $^\circ\text{A}$ e área superficial de 200 a 400 m^2/g são utilizados na separação de solutos de baixo PM (<500). Para moléculas maiores, como proteínas e ácidos nucleicos, são necessários poros maiores (>300 $^\circ\text{A}$) para permitir o acesso do soluto à área interna.

A superfície da sílica pode ser modificada para ser utilizada em diversas aplicações:

2 - Fase ligada: A superfície da sílica é quimicamente modificada com a introdução de hidrocarbonetos pela reação com organoclorosilano (eq. 16.1). A natureza do grupo R_3 determina se a fase ligada resultante se comporta como fase normal, fase reversa ou troca iônica.

eq. 16.1



R_1 e R_2 : grupos metil ou haletos

A principal desvantagem da utilização da sílica ligada ou não é a lenta dissolução em solução aquosa em pH acima de 8,0.

Pré-colunas: Colunas menores que 5 cm de comprimento (pré-coluna) são frequentemente utilizadas na proteção de colunas analíticas e instaladas entre o injetor e a coluna de trabalho (analítica). São necessárias para evitar que impurezas presentes na amostra possam ser adsorvidas pela coluna de trabalho. Embora o tipo de material utilizado no empacotamento da pré-coluna deva ser o mesmo da coluna analítica, o tamanho das partículas é maior (30 a 40 μm), o que facilita o seu empacotamento. A pré-coluna deve ser trocada sempre que sua capacidade for excedida, evitando que os contaminantes passem para a coluna analítica.

Em cromatografia líquida, a fase móvel (líquida) movimenta-se continuamente através da coluna contendo a fase estacionária (sólido). O soluto interage com as fases estacionária e móvel por diversos mecanismos: *adsorção*, *partição*, *exclusão molecular*, *troca iônica* ou *princípios de afinidade*, podendo-se comportar de três modos:

a) Ser completamente particionado na fase móvel, de maneira a ser removido da coluna rapidamente.

b) Ser totalmente adsorvido pela fase estacionária, de modo a permanecer na posição inicial da coluna.

c) Ser parcialmente adsorvido, de modo que possa ser retardado e eventualmente removido da coluna.

Existem vários tipos de colunas, e suas fases estacionárias apresentam características peculiares (Quadro 16.2). Portanto, as seguintes interações podem ocorrer entre os componentes da amostra e os da fase estacionária: *interação hidrofílica*, *interação hidrofóbica* e *troca iônica*. De acordo com essas interações, as separações podem ser divididas em:

Interação	Modo de separação	Fase estacionária
Hidrofílica	Adsorção	Sílica, alumina
	Fase normal	- NH_2 (Aminopropil), CN (Cianopropil)
Hidrofóbica	Fase reversa	- ODS (Octadecil), C_8 (Octil)
		- NH_2 - CN, - TMS (Trimetil), - Fenil
Iônica	Troca catiônica	- Ácido sulfônico
	Troca aniônica	- Amina quaternária
Física	Exclusão	Gel de poliestireno

Quadro 16.2 - Tipos de fases estacionárias para cromatografia líquida de alto desempenho

Descrição	Estrutura	Capacidade	pKa	Polaridade
C18 Octadecil	$-\text{SiC}_{18}\text{H}_{37}$	.		Altamente não-polar
C8 Octil	$-\text{SiC}_8\text{H}_{17}$	.		Moderadamente não-polar
C2 Etil	$-\text{SiC}_2\text{H}_5$	.		Fracamente não-polar
C1 Metil	$-\text{SiCH}_3$	.		Fracamente não-polar
PH Fenil	$-\text{Si}$ 	.		Moderadamente não-polar
CH Cicloexano	$-\text{Si}$ 	.		Moderadamente não-polar
CN Cianopropil	$-\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$	.		Moderadamente não-polar/polar
2 OH Diol	$-\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})_2$	.		Polar
Si Sílica	$-\text{SiOH}$	.		Polar
CBA Ácido Carboxílico	$-\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	.		Troca catiônica fraca
PRS Ácido Propilsulfônico	$-\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+$	0,3 meq/g	4,8	Troca aniônica forte
SCX Ácido Benzenossulfônico	$-\text{SiCH}_2\text{CH}_2$  SO_3H^+	0,8 meq/g		Troca aniônica forte
NH ₂ Aminopropil	$-\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$	0,6 meq/g	9,8	Troca aniônica fraca/polar
PSA Amina Primária/Secundária	$-\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$	.	10,1 e 10,9	Troca aniônica fraca/polar
DEA Dietilaminopropil	$-\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$	.	10,7	Troca aniônica fraca/polar
SAX Amina Quaternária	$-\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$	1,0 meq/g		Troca aniônica forte
PBA Ácido Fenilborônico	$-\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$  $\text{B}(\text{OH})_2$	0,7 meq/g		Co-valente

Cromatografia Sólido-Líquido (Adsorção)

Está relacionada com a interação polar-polar entre os grupos funcionais das partículas do suporte da fase estacionária (sílica-gel, alumina) e os grupos polares das moléculas do soluto. A superfície hidroxilada é o grupo predominante na sílica e na alumina, responsáveis pela adsorção. Essa interação é um fenômeno competitivo, no qual as moléculas da fase móvel e do soluto competem pela superfície (Figura 16.2).

O soluto é adsorvido pela superfície das partículas sólidas (fase estacionária), e a separação das moléculas do soluto ocorre pelo equilíbrio entre o estado adsorvido e a fase líquida. Exemplos de algumas dessas fases são: Partisil, Hiperisil, Sferisorb, Zipax etc. Tipicamente, a fase móvel não-polar é utilizada.

A fase estacionária (adsorvente) é escolhida de forma a permitir a interação diferencial com os componentes da amostra a serem separados. As forças intermoleculares responsáveis pela adsorção incluem: *Van der Waals*, *eletrostática*, *pontes de hidrogênio* e *interações hidrofóbicas*.

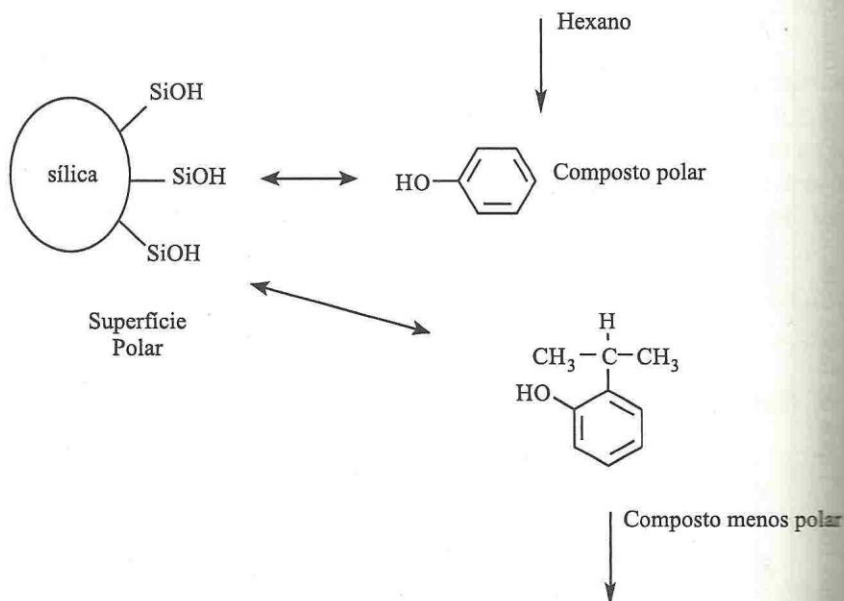


Figura 16.2 - Cromatografia tipo sólido-líquido.

Em cromatografia de adsorção, utilizam-se como fase estacionária sílica (ligeiramente ácida), carvão (não-polar) e alumina (ligeiramente básica). Tanto a sílica como a alumina possuem na superfície grupos hidroxila. Compostos contendo grupos funcionais polares são retidos fortemente no adsorvente polar e, portanto, eluídos por último, enquanto solutos não-polares o são primeiramente.

O mecanismo proposto para explicar este tipo de cromatografia baseia-se na competição entre as moléculas do soluto e do solvente pelos sítios ativos do adsorvente. Assim, com o aumento relativo da adsorção da fase móvel, a adsorção do soluto diminui. Os solventes podem ser então classificados de acordo com a sua força de atração pelo adsorvente. Essa escala de força do solvente ou polaridade é denominada série eluotrópica.

Cromatografia Líquido-Líquido (Partição)

É a distribuição de componentes entre duas fases imiscíveis. É similar à adsorção, exceto para o suporte que contém revestimento líquido, o qual interage com as moléculas do soluto.

A fase líquida estacionária forma um filme na superfície do suporte sólido (terra diatomácea, celulose e sílica). O suporte deve ser inerte e possuir alta superfície, de modo a reter considerável quantidade do líquido de revestimento e que este seja imiscível com a fase móvel.

A fase estacionária é um líquido, e o mecanismo de separação envolve a dissolução dos componentes neste líquido. Obviamente, a polaridade dos componentes e das fases estacionária e móvel tem de ser levada em consideração. Se a fase estacionária é polar, os componentes não-polares se moverão através da fase estacionária mais rapidamente que os polares. O inverso ocorre se a fase estacionária é apolar. O soluto equilibra-se entre a fase líquida móvel e a fase estacionária líquida que reveste a superfície do suporte sólido. A fase móvel carrega a mistura através da fase estacionária líquida, promovendo a partição dos componentes entre a fase móvel e a estacionária. Como resultado, a movimentação dos componentes da mistura ocorre em diferentes velocidades. A desvantagem da utilização desta fase é a possibilidade de sua remoção pelo solvente (fase móvel).

A fase sólida inerte é recoberta de uma fase estacionária líquida (Figura 16.3) e a separação é baseada na solubilidade dos componentes

da amostra com a fase líquida estacionária. A quantidade da fase estacionária utilizada varia de 1,0 a 15%.

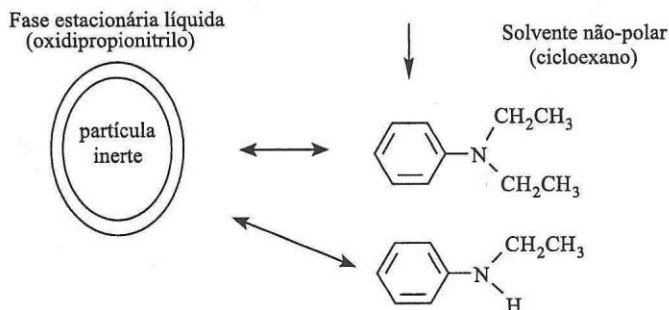


Figura 16.3 - Cromatografia líquido-líquido.

Para se obter uma boa separação, as interações (partição) dos componentes da amostra com as fases móvel e estacionária devem ser controladas. A manipulação do sistema de partição, alterando a natureza das duas fases líquidas, pode ser obtida pela combinação de solventes ou ajustando-se o pH.

Geralmente, o mais polar entre os dois líquidos é mantido estacionário no suporte inerte e o solvente menos polar é utilizado para eluir os componentes da amostra (*cromatografia de fase normal*). O reverso desse arranjo, utilizando-se a fase estacionária não-polar e a fase móvel polar, é conhecido como *cromatografia de fase reversa*.

A fase líquida estacionária pode ser polar ou apolar. Esse tipo de cromatografia também pode ser convenientemente dividido em fases reversa e normal, dependendo se a fase móvel é mais polar que a fase estacionária (*cromatografia de fase reversa*) ou menos (*cromatografia de fase normal*).

Cromatografia de Fase Normal (Adsorção e Partição)

Consiste em métodos, os quais utilizam a fase móvel não-polar em combinação com a fase estacionária polar – grupos funcionais polares não-iônicos, como hidroxilas alcoólica, nitro, ciano (nitrilo) e amino, são

quimicamente ligados à sílica. O fenômeno da adsorção ocorre em razão da natureza muito polar da fase estacionária. Em partição, utiliza-se uma fase líquida polar quimicamente ligada a estas partículas polares, as quais consistem tipicamente de sílica (Si-O-). Exemplos típicos de fase normal ligada são todas aquelas fases nas quais um grupo ciano (-CN), um grupo amina (-NH₂) ou um grupo diol (-CHOH-CH₂OH) fazem parte da estrutura da fase ligada.

Comercialmente, são designadas pela origem do fabricante com nomes como Micropak-CN, μ -Bondapak-CN, Zorbax-NH₂ etc. A cromatografia de fase normal é utilizada para amostras mais polares e solúveis em água, e a ordem de eluição é similar à de cromatografia de adsorção. Solutos não-polares preferem a fase móvel e eluem primeiro, enquanto os solutos polares preferem a fase polar estacionária e eluem por último.

Substâncias *hidrofílicas*, como aminoácidos, carboidratos e pigmentos vegetais solúveis em água, são separáveis por cromatografia de fase normal. Compostos *lipofílicos*, como lipídios e pigmentos solúveis em gordura, podem ser separados por cromatografia de fase reversa.

Cromatografia Sólido-Líquido de Fase Reversa

Mais de 70% de todas as separações por CLAD usam fase reversa, as quais utilizam fase estacionária não-polar e fase móvel polar. Por ser a superfície das partículas sólida e polar, estas não são úteis na separação de compostos não-polares, os quais possuem pouca afinidade pela superfície polar. Para resolver esse problema, é utilizada a fase reversa. A superfície reativa das partículas é alterada pela reação com compostos não-polares, que são quimicamente ligados ao grupo-OH (Figura 16.4).

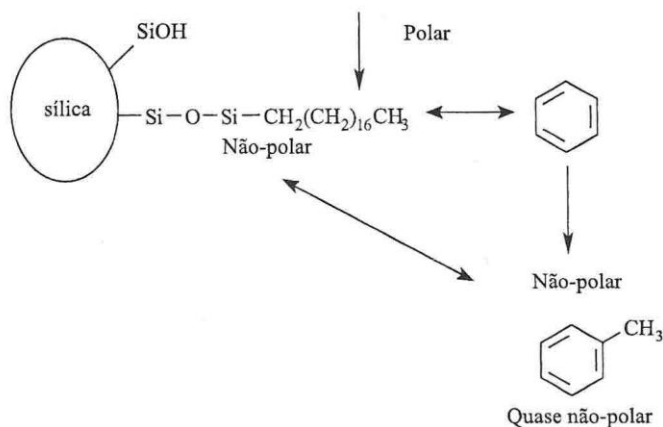


Figura 16.4 - Cromatografia de fase reversa ligada.

Como mencionado anteriormente, a fase estacionária não-polar possui uma estrutura quimicamente ligada às partículas de sílica. A separação é governada pelo caráter hidrofóbico da amostra, envolvendo interações entre o hidrocarboneto saturado (C_8H_{17} ou $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$) e quimicamente ligado à partícula de sílica e a porção não-polar da molécula do soluto. Comercialmente são designadas como μ -Bondapak C_{18} , μ -Bondapak fenil, Nucleosil C-8, Spherisorb ODS (octadecil).

Cromatografia de fase reversa é utilizada para separar amostras com baixa solubilidade em água. A ordem de eluição dos solutos é o inverso da observada na fase normal, ou seja, compostos polares são eluídos primeiro e os solutos não-polares são os últimos a serem eluídos.

Cromatografia Líquida de Troca Iônica

É um tipo de cromatografia de adsorção na qual a interação entre o soluto e a fase estacionária é de natureza eletrostática. O material frequentemente utilizado no empacotamento são resinas orgânicas (sulfonadas ou aminadas). Como o próprio nome indica, é um procedimento utilizado na separação de misturas de íons. A amostra a ser separada é geralmente uma solução aquosa contendo íons orgânicos ou inorgânicos. Cátions ou ânions são co-valentemente ligados à superfície

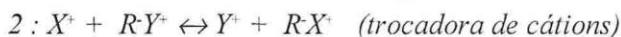
da fase sólida estacionária, e os íons são trocados com a fase móvel. Desse modo, íons que se ligam aos grupos carregados da resina são separados daqueles íons que não interagem com a resina.

A natureza da fase estacionária define o modo de operação: *troca iônica* ou *catiônica* (Quadro 16.2). Resinas do tipo catiônico possuem sítios negativos, de forma que os cátions são permutados, enquanto as resinas trocadoras de ânions possuem cargas positivas, permitindo a troca de ânions, conforme esquema a seguir:



A amostra contendo o íon X^- compete com o íon Y^- da fase móvel pelo sítio R^+ do trocador iônico.

De forma similar, em troca catiônica a amostra contendo cátions X^+ compete com os íons Y^+ da fase móvel pelo sítio R^- do trocador iônico.



Em troca iônica, grupos carregados positivamente estão covalentemente ligados à fase estacionária e interagem com os ânions em solução. Na troca catiônica, grupos carregados negativamente estão covalentemente ligados e interagem com cátions em solução. Interações do tipo carga-carga são responsáveis pela separação. Íons de cargas opostas são atraídos para a fase estacionária, por meio de forças eletrostáticas.

Para eluir o soluto da resina trocadora de íons, a fase móvel deve ser modificada para diminuir as interações, alterando-se o pH ou aumentando a força iônica para enfraquecer as interações eletrostáticas.

Várias substâncias que possuem cargas em determinados pH podem ser separadas. Em pH baixo, concentrações elevadas de H^+ alteram o equilíbrio para a esquerda ($HA \leftarrow H^+ + A^-$) e somente baixas concentrações de A^- competirão pelos sítios do trocador aniônico. Conseqüentemente, uma queda no pH promove a eluição do soluto ácido rapidamente da coluna trocadora de ânion. De forma similar, em pH elevado, concentrações pequenas de H^+ alteram o equilíbrio para a esquerda ($B + H^+ \leftarrow BH^+$), e somente baixas concentrações de BH^+ competirão pelos sítios catiônicos. Portanto, aumentando-se o pH, o soluto básico elui rapidamente da coluna trocadora de cátions.

Resinas do tipo amina quaternária ($-N(CH_3)_3^+$: trocadora de ânions) e ácido sulfônico ($-SO_3^-$: trocadora de cátions) são os escolhidos para a maioria das aplicações.

A fase estacionária (trocadora de íons) possui grupos funcionais fixos que podem ser carregados negativa ou positivamente (Figura 16.5). O grupo funcional da fase estacionária determina se cátions ou ânions serão trocados. *Trocadoras de cátions* possuem cargas negativas co-valentemente ligadas, enquanto *trocadoras de ânions* possuem grupos carregados positivamente. A natureza química dos resíduos ácidos ou básicos determina como a ionização da fase estacionária é afetada pelo pH da fase móvel.

Geralmente, os componentes a serem separados são dissolvidos em solução-tampão com a seguinte característica: 1,5 unidade do pKa acima do mais alto pKa do componente da amostra. Isto assegura que os componentes estarão completamente ionizados e retidos (Figura 16.5). A eluição pode ser obtida por um dos seguintes métodos:

1 - Passando-se a solução-tampão pela coluna, os componentes com elevado pKa são os primeiros a ser eluídos.

2 - Utilizando-se gradiente de força iônica.

3 - Alterando-se o pH. Em troca iônica, o tampão utilizado é mais ácido, e com essa mudança as moléculas são, então, neutralizadas e eluídas. O reverso é feito com troca catiônica. Obs.: *O pH deve ser abaixo de 8,0 para se evitar a dissolução da sílica.*

Aplicações na área de alimentos incluem separação de aminoácidos, proteínas, açúcar, alcalóides e ácidos de frutas.

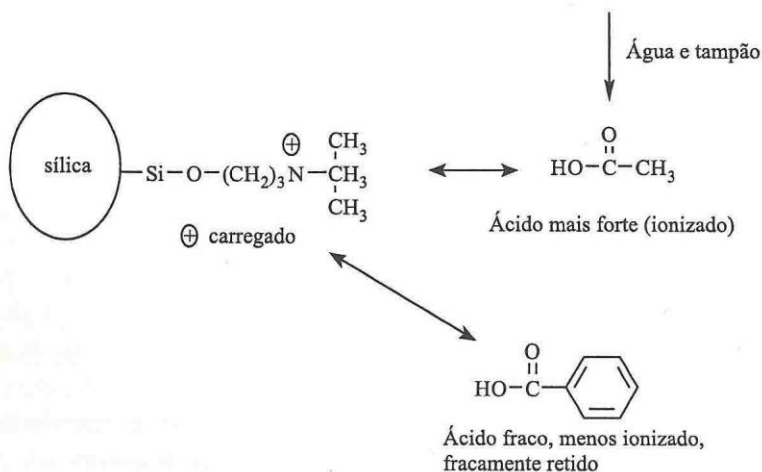


Figura 16.5 - Cromatografia de troca iônica de fase ligada.

Exclusão Molecular

É o método preferido na separação de componentes de alto PM (> 2.000). As colunas utilizadas possuem poros de diversos tamanhos (fase estacionária), cuja separação é baseada na difusão seletiva das moléculas, que entram e saem dos poros presentes na superfície das partículas.

O ideal seria se não houvesse nenhuma força de atração entre a fase estacionária e o soluto. A fase móvel líquida passa continuamente pelos poros do gel, nos quais pequenas moléculas do soluto penetram, ficando retidas por mais tempo na coluna. Moléculas maiores presentes no soluto são excluídas dos poros, permanecendo menos tempo retidas na coluna, que separa moléculas pelo tamanho.

Cromatografia por Afinidade

Utilizam-se interações específicas entre um tipo de molécula do soluto e uma segunda molécula co-valentemente ligada (imobilizada) à fase estacionária. Determinados tipos de moléculas na mistura ligam-se à molécula que está co-valentemente ligada à fase estacionária; todas as outras moléculas são removidas da coluna.

Fase Móvel

Líquidos como água, tampão, acetonitrila, hexano, clorofórmio, propanol etc. são utilizados como fase móvel. A combinação de solventes miscíveis é frequentemente utilizada. Solventes que possuem alta viscosidade devem ser evitados, pois, além do tempo longo para emergirem da coluna, o que resulta na abertura de picos e resolução ruim, é necessária alta pressão para forçá-los através da coluna.

O solvente deve ser desgaseificado e livre de partículas suspensas, bem como de impurezas químicas. Recomenda-se a utilização de solventes de alta pureza, que devem ser filtrados em filtro de teflon de $0,45\ \mu\text{m}$, e de acetato de celulose para solventes aquosos.

Substâncias interferentes devem ser removidas da amostra **por meio** de filtração e, ou, centrifugação. A fase móvel deve **apresentar os** seguintes requerimentos:

- Capacidade de dissolver a amostra.
- Compatibilidade com o detector.
- Alta pureza e ser bombeada à velocidade de 1,0-5,0 ml/min.

A eluição pode ser realizada de duas maneiras: *isocrática*, quando a composição da fase móvel não é alterada no decorrer da separação, e *gradiente*, quando essa composição é alterada no decorrer da análise. Esta última pode ser ainda dividida em duas formas: *linear*, quando o gradiente é alterado de forma contínua e constante, podendo alterar (aumentando ou diminuindo) a composição dos componentes da fase móvel; e *não-linear*, quando a composição da fase móvel aumenta e diminui de forma não-constante.

Fase Estacionária

As fases estacionárias (Quadro 16.3) disponíveis são numerosas, podendo ser polares (Porasil) ou apolares (Bondapak C₁₈) e apresentar estrutura porosa ou sólida e de diversos diâmetros: 5, 10 e 50 µm. As colunas de adsorção podem ser de fase reversa ou de fase normal.

- Limpeza da Coluna

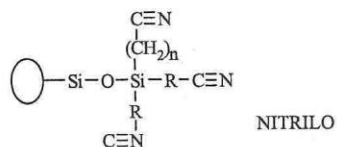
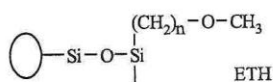
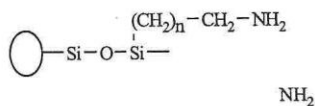
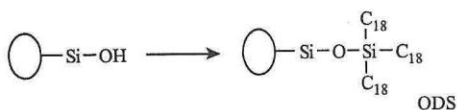
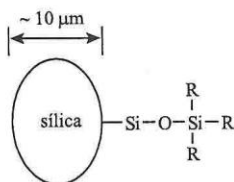
Em face da contaminação da superfície do suporte no decorrer de sua utilização, a coluna se torna inativa e deve ser regenerada. Isso pode ser conseguido com o uso de solventes apropriados e de baixo fluxo (0,1 ml/min) durante a noite.

Colunas de sílica podem ser regeneradas rapidamente com 100 ml de isopropanol, seguido de 100 ml de cada solvente menos polar – acetona, clorofórmio – e, finalmente, hexano com fluxo de 2 a 4 ml/min.

Colunas de fase reversa devem ser lavadas com água, em caso de se ter utilizado tampão como fase móvel, e posteriormente com 50 ml de metanol ou acetonitrila.

Quadro 16.3 - Fase normal e fase reserva: classificação baseada na polaridade das fases móvel e estacionária

	Fase normal	Fase reversa
Fase estacionária	Polar (Sílica)	Apolar Hidroc. lig. sílica
Fase móvel	Apolar (Hexano)	Polar (água, etanol)
Solutos eluídos (primeiro)	Menos polar	Mais polar
Solutos eluídos (último)	Mais polar	Menos polar



Detectores

Os detectores de uso mais freqüente estão descritos a seguir, em ordem de sensibilidade e especificidade. A função deles é gerar um sinal eletrônico proporcional à quantidade de uma mistura de componentes. Este sinal é então enviado para a impressora, e as informações são obtidas na forma de gráficos.

- Índice de Refração

Quando radiações eletromagnéticas passam de um meio para outro, a sua direção pode ser alterada, isto é, ela pode ser refletida ou desviada. O quociente do ângulo de incidência e do ângulo de refração é denominado índice de refração e varia com a concentração, temperatura, pressão e o fluxo.

O índice de refração é utilizado em compostos que não possuem absorção e fluorescência significativa. Monitora, continuamente, a diferença entre o índice de refração de dois líquidos: o de referência (solvente puro) e os componentes da amostra. Este detector não pode ser utilizado em sistema de eluição por gradiente. Se o índice de refração de um composto é diferente do da fase móvel, ele pode ser detectado.

Todas as substâncias possuem o seu índice de refração característico (propriedade física da substância). Tanto a fase líquida como os efluentes da coluna passam pelo detector, e a diferença entre os índices de refração é enviada na forma de sinal elétrico para o registrador.

- Absorbância

Essencialmente, é um espectrofotômetro UV/VISÍVEL, operando na faixa de 190 a 700 nm. Na faixa do UV, utiliza-se lâmpada de deutério e, na faixa do visível, de tungstênio, podendo ser empregado em sistema de eluição por gradiente. Toma-se a leitura a um comprimento de onda fixo, após zerada a absorbância do solvente.

- Fluorescência

Compostos fluorescentes podem ser excitados em determinado comprimento de onda, enquanto a absorbância é tomada em outro. São utilizados principalmente na detecção de substâncias que absorvem no mesmo comprimento de onda.

A diferenciação é possível, pois esse tipo de detector identifica os componentes mediante dois parâmetros distintos: *comprimento de onda de excitação e de emissão*.

Determinação do Hexanal

Reagentes

- Hexanal, acetonitrila, tetraidrofurano.
- Hexano, metanol, HCl 0,3 N e H_3PO_4 1,1 N.
- Solução 0,1% de 2,4-dinitrofenilidrazina (HCl- H_3PO_4 1:1).

Procedimento

- Colocar grãos de soja (0,5-1,0 g) em repouso em água, durante a noite, na geladeira.

- Remover a casca e homogeneizar com 10 ml de água gelada.

- Transferir para o funil de separação 1,0 ml de extrato e adicionar 25,0 ml de hexano e 20,0 ml da solução 2,4-DNP. Agitar durante uma hora e coletar a fase orgânica.

- Lavar a fase aquosa com 25,0 ml de hexano sob agitação/30min; combinar a fase orgânica e lavar com água.

- Concentrar e dissolver o resíduo em 1,0 ml de metanol.

* *Preparo da solução-padrão* – Os aldeídos são derivatizados com o 2,4-DNP e determinados como 2,4-dinitrofenilidrazonas (DNPHs): solução de 2,4-DNP (0,4 g) em 0,2 ml H_2SO_4 conc. + 3,0 ml H_2O + 10,0 ml ETOH e 0,5 g padrão + 20,0 ml ETOH.

Aparelhagem e condições de uso

- Detecção no UV a 350 nm.
- Coluna Lichrosorb RP-18 (5 μm , 4,0 x 250 mm).
- Fase móvel: acetonitrila:água:tetraidrofurano (75:24:1).
- Fluxo: 1,0 ml/min.
- Volume injetado: 20 - 40 μl .

Determinação do BHT em Banha de Porco

Reagentes

- Banha de porco, isopropanol, hexano.
- BHT recristalizado em etanol.

Procedimento

- Dissolver 2,5 g de banha em 25,0 ml da fase móvel.
- Filtrar e injetar 20 e 40 μ l.

* Preparo da solução-padrão:

- Solução A: 100 mg de BHT dissolvidos em 10,0 ml da fase móvel (10,0 mg/ml).
- Solução B: 0,1 ml da *solução A* diluído em 5,0 ml da fase móvel (0,2 mg/ml).
- Fazer a curva-padrão, utilizando a *solução B*, conforme os dados a seguir:

Vol. inj. (μ l)*	BHT (μ g)	Área do pico
1,0 μ l	0,2	?
2,0 μ l	0,4	?
3,0 μ l	0,6	?
4,0 μ l	0,8	?
5,0 μ l	1,0	?

* = duplicata.

Aparelhagem e condições de uso

- Detecção no UV a 280 nm.
- Coluna: Micropak Si-5 (4,0 x 300 mm).
- Fase móvel: 1,0% de isopropanol em hexano.
- Fluxo: 1,0 ml/min.

Determinação de Cafeína em Bebidas

Procedimento

- Preparar uma solução-estoque de cafeína (1,5 mg/ml) e, a partir desta, 4 a 5 soluções aquosas-padrão contendo de 1,0 a 50 ppm de cafeína.
- Preparar amostra (chá, café, coca-cola etc.), filtrar e diluir em água (1:5, 1:10 e 1:20).

Aparelhagem e condições de uso

- Detecção no UV a 254 nm.
- Coluna de fase reversa (C_{18} ou C_8).
- Fase móvel: MeOH : H_2O (30:70).
- Fluxo: 1,0 ml/min.

Quantificar a cafeína pelo método da padronização externa.

Determinação de Glicoalcalóides

Reagentes

- Fosfato de amônio, acetonitrila e metanol.
- Solução-padrão de glicoalcalóides.

Procedimento

- Preparar amostra conforme descrito no Capítulo 6.
- Injetar volume adequado da amostra.
- Preparar a curva-padrão, utilizando os padrões de glicoalcalóides dissolvidos em metanol (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Aparelhagem e condições de uso

- Detecção: UV a 202 nm.
- Coluna: Licrosorb RP-8 (5 μm , 25 cm x 3 mm).

- Fase móvel: 0,29 g de fosfato de amônio dissolvido em 250 ml de água destilada, seguido de 250 ml de acetonitrila.
- Fluxo: 0,8 ml/min.

EXERCÍCIOS

- 1 - Escolher a alternativa correta:

Em CLAD de fase reversa, a fase estacionária é *polar* ou *apolar* em relação à fase móvel, e o composto mais (*polar* ou *apolar*) elui primeiro. Se o HETP de uma coluna cromatográfica de 50 cm é 0,5, o valor de N deve ser 10 ou 100. Se este valor de N for reduzido, a coluna será (*mais* ou *menos*) eficiente.

- 2 - Diferenciar a eluição isocrática da gradiente.

3 - Aflatoxinas ocorrem normalmente em níveis de ppb. Analisando uma amostra de milho, encontrou-se 1,0 $\mu\text{g/kg}$. Expressar esse resultado em ppb, % e ppm de aflatoxina.

4 - Na análise de BHT em banha de porco por CLAD, obtiveram-se os seguintes resultados:

a) Preparo da solução-padrão de BHT, conforme descrito anteriormente.

b) Preparo da curva-padrão:

Vol. sol. B (μl)	BHT (μg)	Área
1,0 (duplicata)	?	4.500
2,0 "	?	8.400
3,0 "	?	12.700
4,0 "	?	17.000
5,0 "	?	22.000

c) Determinar a equação de regressão dos dados do item B.

d) A partir dos valores obtidos da injeção da amostra seguinte, calcular, pela equação de regressão, a quantidade de BHT na amostra em %, ppb e ppm:

Vol. amostra (ml)	Área do pico	Conc. BHT. (% , ppb, ppm)
20 (duplicata)	5.000	?
40 "	8.000	?

5 - A partir dos resultados a seguir, obtidos de aflatoxina em milho, calcular a concentração expressa em %, ppb e ppm, observando-se as seguintes informações:

- Preparo da amostra conforme descrito anteriormente (CLAD).
- Volume da amostra injetado - 10,0 µl.
- Solução-padrão de aflatoxina B₁ - 11,70 mg/l.
- Tomar 100 µl da solução-estoque + 1,0 ml da fase móvel.
- Curva-padrão (duplicata):

Vol. inj. (µl)	Aflat. (µg)	Área
5,0 µl	?	2.024
10,0 µl	?	3.878
15,0 µl	?	6.113
20,0 µl	?	7.354
25,0 µl	?	8.343
Amostra (10 µl)	?	5.967

REFERÊNCIAS

- FALLON, A.; BOOT, R. F. G.; BELL, L. D. *Applications of HPLC in biochemistry*. Amsterdam: Elsevier, 1993. 338p.
- HURST, W. J. *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals*. New York: CRC Press, 2002. 400 p.
- ANÔNIMO. *Fundamentals of liquid chromatography*. São Paulo: Centro Educacional Edisa. 170 p.
- HURST, W. J. *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals*. New York: CRC Press, 2002. 400 p.

MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Introdução

A microextração em fase sólida (MEFS) é uma técnica relativamente nova utilizada na extração ou pré-concentração rápida de compostos orgânicos voláteis e semivoláteis sem a utilização de solventes. Basicamente, consiste de dois processos: *partição* de compostos orgânicos entre a fase aquosa ou vapor e o filme polimérico coberto da sílica fundida; e *dessorção* do concentrado no instrumento analítico (Figura 17.1). No primeiro processo, a fibra é inserida na amostra e os componentes são extraídos; posteriormente, ela é transferida para o cromatógrafo de fase gasosa, onde ocorre a dessorção, seguida pela separação e quantificação.

A MEFS é independente da forma da matriz (sólido, líquido e gás), podendo esta ser toda prontamente amostrada. É uma técnica de extração que requer o controle de diversos parâmetros. Cada componente se comportará diferentemente, dependendo de sua polaridade, volatilidade, coeficiente de partição orgânica/água, volume da amostra ou volume do *headspace*, velocidade da agitação, pH da solução e temperatura. A incorporação de um padrão interno na matriz e a padronização do tempo de amostragem resultam em excelente correlação quantitativa. Como esta técnica não requer a utilização de solventes e pode ser carregada sem aquecimento da amostra, a formação de compostos indesejáveis é eliminada.

A mecânica da extração é ilustrada na Figura 17.1. A amostra é colocada no vidro e selada (septo de borracha com capa metalizada). Antes de se iniciar o procedimento de análise, a fibra deve ser limpa, pois

o polímero pode estar contaminado com alguma substância presente no ar. A limpeza pode ser feita em alguns minutos, inserindo a fibra no injetor do cromatógrafo de fase gasosa. Após a limpeza, para amostra líquida, a fibra é inserida diretamente na solução; e, para análise em *headspace*, a fibra é estendida até a fase gasosa acima da amostra líquida ou sólida. Em ambas as técnicas, a adição de cloreto de sódio na solução auxilia o equilíbrio da fase orgânica da fibra. A presença do sal influencia o processo de adsorção de duas formas: alterando as propriedades da fase e diminuindo a solubilidade dos compostos hidrofóbicos na fase aquosa (*salting-out*).

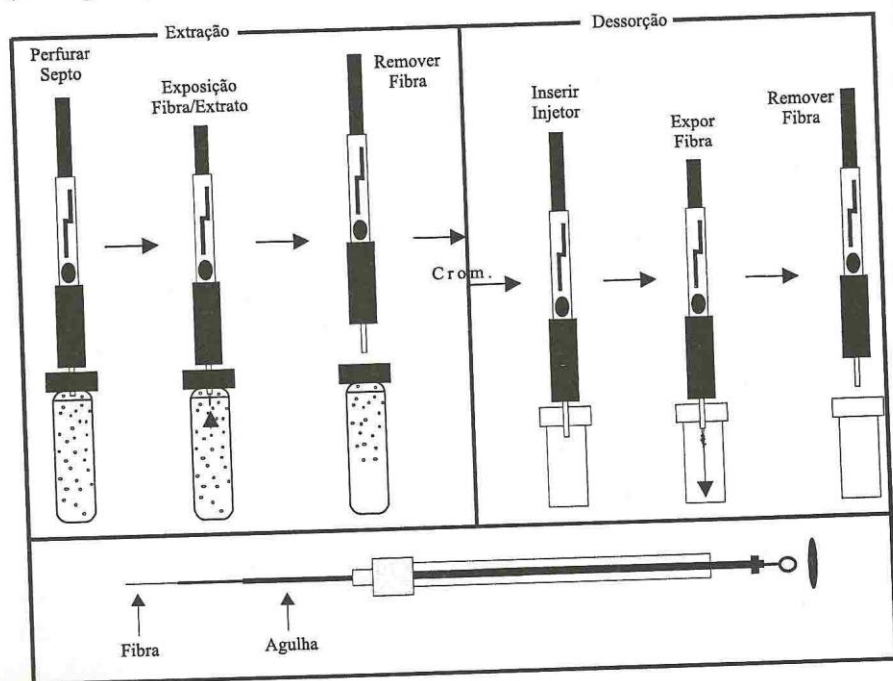


Figura 17.1 - Representação gráfica do extrator de microextração em fase sólida.

A agitação com auxílio de barra magnética aumenta a velocidade do equilíbrio. Após um tempo adequado de amostragem (1-20 minutos), a fibra é retirada e inserida diretamente no injetor do cromatógrafo por 1-2 minutos. As substâncias químicas absorvidas são termicamente

dessorvidas pelo aquecimento do injetor e transferidas diretamente para a coluna. Como esta técnica envolve uma pré-concentração de substâncias diluídas, a razão de divisão do injetor *split/splitless* deve ser mantida baixa ($\sim 10:1$). Para aplicações em que os componentes não se encontram em níveis-traço, utilizam-se elevados valores de divisão da amostra. Deve-se ficar atento durante a injeção, para assegurar que a parte de cima da superfície do algodão, de vidro ou de outro material utilizado no empacotamento da coluna, esteja localizada abaixo da ponta da fibra, evitando assim a sua ruptura.

Tipos de Fibra

Na MEFS, o analito pode ser adsorvido do líquido (imersão) ou da amostra sólida (*headspace*) e, posteriormente, inserido diretamente no injetor do cromatógrafo, para que ocorra a dessorção térmica. A extremidade da fibra de sílica fundida é coberta com um filme de fina espessura contendo a fase estacionária. Este filme serve como solvente “orgânico” durante a absorção dos compostos voláteis da matriz. Diversos tipos de fibras com certo grau de seletividade encontram-se disponíveis (Tabela 17.1). Para uso geral, fibras com filme não-polar mais espessas conferem alta sensibilidade à maioria dos compostos.

Tabela 17.1 - Revestimento comercialmente disponível e indicações de uso

Revestimento – μM	Natureza	Aplicações
PDMS – 7	Não-polar	Substâncias apolares de alto PM
PDMS – 30		Substâncias semivoláteis não-polares
PDMS – 100		Substâncias voláteis
PA – 85	Polar	Substâncias semivoláteis polares
CW/TR – 50		Surfactantes
CW/DVB – 65		Álcoois e compostos polares
CW/DVB – 70	Bipolar	Álcoois e compostos polares
Car/DVB – 50/30		Flavorizantes – voláteis e semivoláteis
PDMS/DVB – 60		Aminas e compostos polares
PDMS/DVB – 65		Voláteis, aminas e nitroaromáticos
Carboxen/PDMS – 75		Gases e substâncias de baixo PM

PDMS: polidimetilsiloxano; CW: carbowax; DVB: divinilbenzeno; PA: poliacrilato.

As fibras com a fase não-polar de polidimetilsiloxano (similar a SE-30 ou OV-101) e as fibras polares de poliácrlato de diversas espessuras (100, 85, 30 e 7 μm) estão disponíveis no mercado. Para a maioria das análises, especialmente de compostos voláteis, fibras de espessura de 100 μm de polidimetilsiloxano são preferidas. Em caso de necessidade de um rápido equilíbrio, a fibra de 30 μm é mais apropriada, e as de espessura de 7 μm funcionam muito bem para amostra contendo componentes de alto ponto de ebulição, ou quando se necessita de temperaturas elevadas para promover a dessorção dos componentes no injetor cromatográfico. Em geral, fibras de filme mais espessas requerem tempo de equilíbrio maior, mas, em compensação, devido à grande massa de componente absorvido, conferem maior sensibilidade.

O tipo da fibra é determinado pelo PM e pela polaridade do analito. Para compostos de baixo PM ou voláteis, utiliza-se fibra de polidimetilsiloxano (PDMS)-100 μm . Compostos de alto PM ou semivoláteis são mais eficientemente extraídos com a fibra de PDMS-7 μm ou de 30 μm . Para a extração de analitos polares, utiliza-se a fibra de poliácrlato.

Considerações Teóricas

Essencialmente, os princípios que afetam a extração de compostos orgânicos de uma solução utilizando-se a MEFS são os mesmos que controlam a partição entre as fases líquidas imiscíveis no funil de separação. Portanto, os fatores que afetam a eficiência (tempo de contato, eficiência na mistura, pH, concentração do sal, temperatura, razão das fases etc.) afetam também a partição da MEFS. O equilíbrio é estabelecido entre a concentração do analito em solução ou na fase sólida, no *headspace* acima da amostra e na fase da fibra.

O volume da fibra é muito pequeno em relação à fase aquosa, e a massa do analito absorvido pelo filme está diretamente relacionada com a sua concentração inicial na solução e com o coeficiente de distribuição que controla o equilíbrio. O princípio de controle da partição baseia-se no

equilíbrio estabelecido entre o analito e a fibra orgânica e a solução, podendo ser descrito da seguinte forma:

$$[X]_l \Leftrightarrow [X]_f, \text{ portanto } K_{lf} = \frac{[X]_f}{[X]_l}$$

em que $[X]$ é a concentração da substância na solução (l) e na fase orgânica da fibra do MEFS (f); e K_{lf} é o coeficiente de partição para o X entre a fase líquida e a fibra.

O K_{lf} , geralmente, eleva-se com o aumento do PM e do ponto de ebulição da substância. A quantidade de material absorvido da solução pela fibra pode ser descrita pela relação:

$$n = \frac{C_o V_l V_f K_{lf}}{K_{lf} V_f + V_l}$$

em que n = quantidade do composto X absorvida pela fibra;

C_o = concentração inicial do composto X em solução; e

V_l e V_f = volumes respectivos da solução e da fase orgânica da fibra.

Para se obter uma extração quantitativa (> 90% da substância absorvida pela fibra), o coeficiente de distribuição de X necessita ser muito maior que o volume da relação V_l / V_f do sistema. Para informações quantitativas, não é necessária uma extração completa, uma vez que a quantidade da substância na fase MEFS é controlada por várias constantes de distribuição que ocorrem nas condições experimentais. Se as condições são cuidadosamente repetidas entre as extrações, a concentração de equilíbrio nas fases permanecerá constante.

No caso da extração por *headspace*, o equilíbrio da partição ocorre entre a fase orgânica líquida da fibra e a fase de vapor acima da amostra líquida ou sólida. A difusão das substâncias contidas na fase de vapor para a fibra é cerca de quatro vezes maior que em solução. A velocidade de análise por *headspace* reflete a sua grande difusividade, podendo reduzir o tempo de extração de 5 min para 1 min ou menos. O aquecimento da amostra aumenta a difusão das substâncias para a fase de vapor.

Aplicações Práticas

Preparar inicialmente uma mistura-padrão contendo os possíveis componentes da amostra, utilizando o seguinte procedimento: misturar 100 ml ou 100 mg de cada padrão e, a partir desta mistura, preparar uma solução-estoque, retirando 50 ml da mistura original, e diluir para 2,0 ml com etanol absoluto. Posteriormente, preparar a solução de trabalho, removendo 10 ml da solução-estoque, e diluir para 10 ml com água, obtendo-se aproximadamente 1 ppm de cada componente em 0,1% (v/v) de solução.

1) *Frutas em pedaços* – O aroma de frutas frescas compreende uma série de misturas complexas de *álcoois*, *aldeídos*, *ésteres* e *terpenóides*, que podem ser alteradas durante a fase de maturação, armazenamento e processamento. Desse modo, o estudo da composição da fração volátil pode ser utilizado para monitorar a qualidade.

Analisar por *headspace* os pedaços de frutas (1,0 - 2,0 g) acondicionados em frascos de 15 ml selados à temperatura ambiente durante 10 min, em fibra de PDMS-100 μm , seguido de 1 min de dessorção.

Condições cromatográficas:

- Coluna: HP -1 (30 m x 0,25 mm x 1,0 mm)
- Injetor: 235 °C (*split*)
- Forno: 60 °C/1 min e gradiente de 4 °C/min até 230 °C
- Detector: FID

2) *Suco de frutas* – Utilizar 3,0 ml da amostra em frasco de 5 ml e acrescentar 0,6 g de NaCl. Imergir durante 10 min a fibra (PDMS-100 μm) sob agitação, seguido de 3 min de dessorção.

Condições cromatográficas:

- Coluna: Carbowax 20 M (30 m x 0,25 mm x 1,0 mm)
- Injetor: 200 °C (modo *splitless*, fechado por 2 min)
- Forno: 50 °C/2 min e gradiente de 4 °C/min até 220 °C
- Detector: FID

3) *Óleo de limão* – O óleo essencial de limão é uma mistura de hidrocarbonetos do grupo de terpenos e sesquiterpenos, compostos oxigenados, além de pequenas percentagens de parafinas e ceras. O limoneno é o seu principal constituinte, sendo os aldeídos neral e geranial, encontrados na proporção de 2,4 a 4%, os responsáveis pelo aroma e pela qualidade do óleo.

Tomar 0,5 g do óleo em frasco de 5 ml e inserir a fibra (PDMS-100 μm) no *headspace*/1 min a 30 °C, seguido da dessorção de 5 segundos.

Condições cromatográficas:

- Coluna: HP-1 (30 m x 0,25 mm x 1,0 mm)
- Injetor: 250 °C (modo *split* 100:1)
- Forno: 40 °C e gradiente de 4 °C/min até 220 °C
- Detector: FID

4) *Óleo vegetal* – Os ácidos graxos são sensíveis à oxidação com o decorrer do tempo, sendo essa sensibilidade acelerada pela exposição a luz, temperatura elevada ou metais. O aumento de compostos voláteis formados durante a oxidação é indicador da rancificação.

Tomar 3,0 g do óleo em frasco de 10 ml. Inserir a fibra (PDMS-100 μm) no *headspace*/45 min a 40 °C, seguido de 1,5 min de dessorção.

Condições cromatográficas:

- Coluna: HP-5 (30 m x 0,25 mm x 1,0 mm)
- Injetor: 250 °C (modo *splitless*, fechado por 1 min)
- Forno: 40 °C/5 min e gradiente de 4 °C/min até 220 °C
- Detector: FID

5) *Café* – Diversas reações complexas ocorrem durante a torrefação do café, produzindo *flavor* característico, constituído de uma mistura de compostos heterocíclicos, aldeídos, álcoois, fenóis, ésteres etc. Estes podem ser alterados em razão da sua origem e do tratamento tecnológico. A quantidade e a composição dos precursores do *flavor* no grão verde apresentam efeitos substanciais no produto torrado. Polissacarídeos, lípidios e proteínas são os principais constituintes do grão verde. Entretanto, os componentes menores, como aminoácidos livres,

trigonelina, ácido clorogênico e açúcares, são importantes fontes de aroma do café.

Tomar 1,0 g do pó de café ou 3,0 ml da bebida em frasco de 10 ml, fechando-o hermeticamente. Equilibrar as amostras inicialmente em estufa a 60 °C/2 h e, posteriormente, inserir a fibra de PDMS-100 µm no *headspace*/5 min/dessorção de 3 min.

Condições cromatográficas:

- Coluna: DB-Wax (30 m x 0,25 mm x 1,0 mm)
- Injetor: 250 °C (modo *splitless*, fechado por 1 min)
- Forno: 45 °C/10 min e gradiente de 3 °C/min até 190 °C
- Detector: FID

Para análise por imersão da bebida, tomar 8,0 ml e transferir para o frasco de 10 ml, fechando-o hermeticamente. Equilibrar a amostra a 40 °C/ 30 min com agitação e, posteriormente, inserir a fibra de PDMS-7 µm/ 5 min/dessorção de 5 min.

Condições cromatográficas:

- Coluna: DB-Wax (30 m x 0,25 mm x 1,0 mm)
- Injetor: 270 °C (modo *splitless*, fechado por 1 min)
- Forno: 40 °C/1 min e gradiente de 3 °C/min até 150 °C/15 min e 5 °C/min até 250 °C
- Detector: FID

6) *Condimentos* – A qualidade destes produtos (aroma e *flavor*) varia, dependendo do país de origem, do processamento, do tempo de armazenamento, do tipo de embalagem etc.

* *Pimenta-preta*: Tomar 40 mg da amostra e triturá-los. Transferir rapidamente para frasco de 4 ml. Inserir no *headspace* a fibra de PDMS-100 µm/5 min em temperatura ambiente, seguido de dessorção de 1 min.

* *Curry*: Tomar 100 mg da amostra em frasco de 4 ml, equilibrado a 55 °C/10 min. Inserir a fibra de PDMS-100 µm/5 min, seguido da dessorção de 1 min.

Condições cromatográficas:

- Coluna: DB-1 (30 m x 0,25 mm x 1,0 mm)
- Injetor: 235 °C (*split*)
- Forno: 60 °C/1 min e gradiente de 4 °C/min até 235 °C.
- Detector: FID

REFERÊNCIAS

- AKIYAMA, M.; MURAKAMI, K.; IKEDA, M. Analysis of the headspace volatiles of freshly brewed Arabic coffee using solid-phase microextraction. **Journal of food Science**, v. 72, p. 388-396, 2007.
- HURST, W. J. **Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals**. New York: CRC Press, 2002. 400 p.
- ZANG, X., PEPPARD, T. Solid-phase microextraction for *flavor* analysis. **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, p. 1922-1925, 1994.
- ZANG, Z.; PAWLISZYN, J. Head space solid-phase microextraction. **Anal. Chem.**, v. 65, p. 1843-52, 1993.
- ZHANG, Z.; YANG, M. P.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction. **Anal. Chem.**, v. 66, p. 844-853, 1994.

EXTRAÇÃO COM CO₂-SUPERCRÍTICO

Introdução

A extração com CO₂-supercrítico é uma técnica que utiliza o poder solvente do dióxido de carbono (CO₂) em temperatura e pressão próximas e acima do *ponto crítico*.

Fluidos supercríticos são definidos como qualquer substância mantida acima da sua temperatura e pressão críticas. A temperatura crítica é a temperatura mais alta, na qual o gás pode ser convertido em líquido pelo aumento da pressão. A pressão crítica é a pressão mais elevada, na qual o líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura do líquido. Acima da pressão crítica, as propriedades do líquido e do gás se tornam idênticas, e este gás, altamente denso, é denominado fluido supercrítico.

A primeira observação do poder solvente dos fluidos supercríticos ocorreu há mais de 120 anos, porém o seu potencial de aplicação só foi explorado recentemente. Além do uso em laboratórios, é utilizado em escala industrial na descafeinação do café e extração de lúpulo em substituição ao cloreto de metileno; na extração e desodorização de óleos vegetais e gordura animal; e na extração e recuperação de aromas de diversas origens etc. (Quadro 18.1).

Fluidos supercríticos são caracterizados pela alta densidade, baixa viscosidade e difusividade intermediária entre gases e líquidos. Esta propriedade não-usual torna os fluidos supercríticos um solvente potencialmente muito bom.

Quadro 18.1 - Aplicações do CO₂- SC em alimentos

Aplicação	Referência
1 - Remoção de colesterol e lipídios em carnes, ovos e produtos de laticínios.	BRADLEY, 1989 CHAO, 1991 ARNTFIELD, 1992 FRONING, 1990 RIZVI, 1994
2 - Extração de pigmentos	DEGNAN, 1991 SPANOS, 1993 MARSILI, 1993
3 - Remoção de ácidos graxos	KASHULINES, 1991 ABDULLAH, 1994
4 - Extração de óleo essencial	VERSCHUERE, 1992 HAWTHORNE, 1993 BLANCH, 1994
5 - Extração de flavorizantes	TEPELLI, 1988 LIANG, 1991
6 - Extração de óleos vegetais	BRANNOLTE, 1983 ZHAO, 1987 FATTORI, 1988 DELVALLE, 1989 NILSSON, 1991 RAMSAY, 1991
7 - Refinamento de azeite de oliva	BRUNETTI, 1989 GONÇALVES, 1991
8 - Extrato de lúpulo	VERSCHUERE, 1992 VITZHUM, 1978
9 - Extração de cafeína	SUGIYAMA, 1985
10 - Extração de antioxidante	DJAMARTI, 1991 HAWTHORNE, 1988
11 - Concentração de tocoferóis	NICOLINO, 1995 IGLESIAS, 1995
12 - Extração do óleo de café	SANDI, 2003

De todos os fluidos com potencial de utilização, destaca-se o dióxido de carbono (CO_2), pelas seguintes razões:

- A temperatura crítica do CO_2 é ligeiramente acima da temperatura ambiente ($31,1^\circ\text{C}$), o que evita a destruição de substâncias termossensíveis.

- A pressão crítica do CO_2 (73,8 bars ou 1.071 psi) não é difícil de ser obtida.

- O CO_2 não é inflamável. É inodoro e quimicamente inerte.

- O CO_2 é disponível em alta pureza a baixo custo e não representa risco ambiental.

Outros fluidos (Tabela 18.1) são utilizados, especialmente o óxido nítrico, que apresenta temperatura e pressão críticas similares às do CO_2 , mas com a desvantagem de ser suscetível a explosão, fogo e toxidez. O dióxido de carbono, portanto, é um solvente atrativo para ser utilizado na indústria de alimentos, em face de suas características mencionadas anteriormente.

Tabela 18.1 - Condições críticas para vários solventes

Solventes	Temperatura crítica ($^\circ\text{C}$)	Pressão crítica (bar)
Dióxido de carbono	31,1	73,8
Óxido nítrico	36,5	71,4
Etano	32,2	48,8
Etileno	9,3	50,4
Propano	96,7	42,5
Propileno	91,9	46,2
Cicloexano	280,3	40,7
Isopropanol	235,2	47,6
Benzeno	289,0	48,9
Tolueno	318,6	41,1
P-Xileno	343,1	35,2
Triclorofluorometano	198,1	44,1
Amônia	132,5	112,8
Água	374,2	220,5

Fluidos Supercríticos

Antes de conceituar o ponto crítico, é preciso tecer alguns comentários a respeito dos líquidos e de seu ponto de ebulição e de como este pode ser alterado com a pressão.

O ponto de ebulição é a temperatura na qual o líquido passa para a forma de gás; o da água é 100 °C, ao nível do mar. Este valor é menor quando medido, por exemplo, no alto de uma montanha. Este mesmo efeito pode ser conseguido em laboratório, utilizando-se bomba de vácuo, conforme mostrado a seguir:

Pressão (1 bar = 14,5 psi)	Ponto de ebulição (°C)
1,0	100,0
0,9	97,0
0,8	94,0
0,7	90,0
0,6	86,0
0,5	81,0

Essas informações podem ser expressas na forma de gráfico, no qual cada ponto da curva corresponde à temperatura de ebulição em determinada pressão (Figura 18.1).

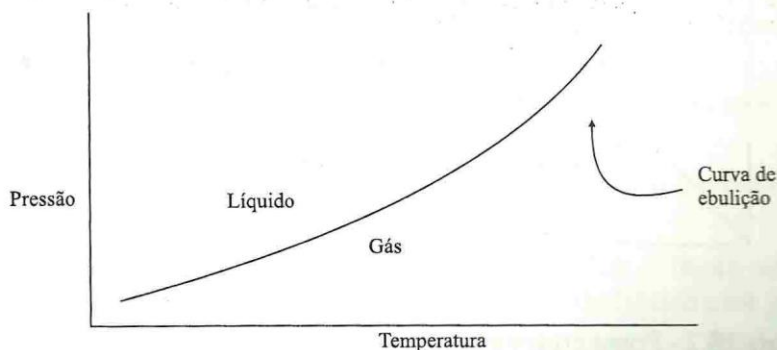


Figura 18.1 - Curva do ponto de ebulição.

Esse tipo de curva não é restrito à água, pois todas as substâncias possuem curva similar. Esta não prossegue indefinidamente, separando a região gasosa da líquida; termina com determinada combinação da temperatura e pressão, denominada *ponto crítico*. A temperatura necessária para se atingir o ponto crítico é denominada *temperatura crítica*, e a pressão neste ponto é a *pressão crítica*. Os valores exatos dependem dos fluidos.

O estado supercrítico é alcançado quando a temperatura e a pressão de uma substância são aumentadas acima de seu valor crítico (Figura 18.2). Nesse estado, não há distinção entre a fase líquida e a gasosa, o fluido não pode ser liquefeito pelo aumento da pressão e o aumento da temperatura não forma gás. Portanto, as propriedades físico-químicas de determinado fluido, como densidade, difusividade, constante dielétrica e viscosidade, podem ser facilmente controladas, alterando-se a pressão ou a temperatura, sem avançar a divisão de fase.

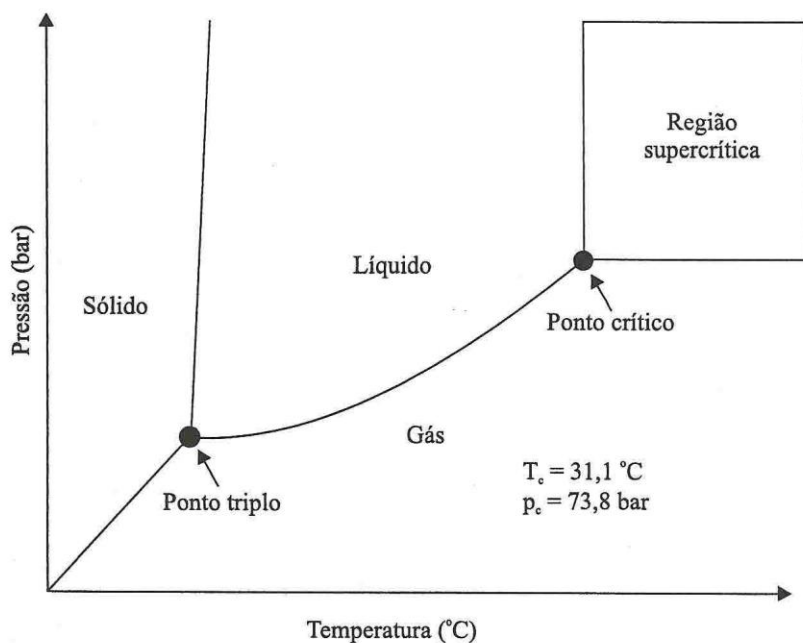


Figura 18.2 - Ponto crítico e região supercrítica.

O poder solvente do fluido supercrítico depende da sua densidade, que é, diferentemente do solvente líquido, altamente ajustável, alterando-se a pressão ou a temperatura. Especialmente próximo do ponto crítico, pequeno aumento da pressão aumenta a densidade do fluido, mas o efeito é menor quando se distancia do valor crítico. Assim, o poder solvente de um fluido pode ser mais facilmente controlado que o do solvente líquido. Contudo, o fluido supercrítico possui maior coeficiente de difusão e mais baixa viscosidade que o solvente líquido, o que significa transferência de massa mais favorável.

Apesar de apresentar inúmeras vantagens, a utilização do dióxido de carbono é limitada por ser um solvente essencialmente não-polar, dificultando assim a extração de muitos compostos polares e iônicos. O seu baixo poder solvente deve-se à baixa constante dielétrica, situada entre 1,4 e 1,5, enquanto a grande maioria dos solventes orgânicos possui constante dielétrica variando de 2,5 a 4,0. Para efeito de comparação, a constante dielétrica da água é de aproximadamente 78.

Um gás, quando comprimido isotermicamente em pressão maior que a sua pressão crítica, aumenta o seu poder solvente na vizinhança de sua temperatura crítica. Em tal situação, esse gás é denominado fluido supercrítico, e seu correspondente estado dinâmico é ilustrado na Figura 18.2.

A área acima, à direita do ponto crítico, é denominada *região supercrítica*. O fluido se torna supercrítico quando é mantido em temperatura suficientemente alta (acima da temperatura crítica), de forma que as forças de atração intermolecular sejam insuficientes para promover a condensação. Portanto, é necessário manter o fluido em pressão superior à do ambiente.

Na região supercrítica, o fluido não possui características nem de líquido nem de gás, mas contém propriedades de ambos:

- Não importa o valor da pressão que é aplicada, pois o fluido **nesta** região não irá condensar.
- Não importa se a temperatura é aumentada, pois o fluido **nesta** região não entrará em ebulição. Por não ser considerado **líquido nem gás**, utiliza-se a terminologia *fluido*.

Técnicas de Extração

A solubilidade de um composto no solvente supercrítico é dependente da densidade do solvente, bem como da afinidade físico-química do soluto pelo solvente. Os compostos dissolvidos podem ser recuperados simplesmente pela diminuição da temperatura e, ou, pressão, as quais reduzem a densidade do fluido. A densidade do fluido supercrítico é muito sensível a pequenas alterações da temperatura e, ou, pressão na região do seu ponto crítico.

A habilidade do CO_2 no estado supercrítico de extrair componentes da matriz depende da solubilidade da substância no fluido supercrítico, da interação do componente com a matriz, da localização e da porosidade da matriz. Conhecendo-se somente a informação sobre a solubilidade da substância no líquido supercrítico, nem sempre é possível fazer uma previsão da sua extração de determinada matriz. Por exemplo, a cafeína é solúvel no CO_2 -supercrítico, mas ela não é extraída do grão se este estiver seco.

A extração pode ser conduzida no modo estático, dinâmico ou no modo acoplado estático/dinâmico. A extração estática é conduzida quando uma quantidade fixa de CO_2 interage com a amostra, de modo análogo ao que ocorre com a interação entre o chá e a água quente. O vaso extrator contendo a amostra é então pressurizado em determinada temperatura. A alta difusividade do líquido no estado supercrítico penetra na matriz, removendo o componente. Tipicamente, a extração estática é seguida da dinâmica para completar a extração. O modo estático é freqüentemente utilizado quando modificadores e reagentes de derivatização são empregados. A extração dinâmica utiliza continuamente o CO_2 passando pela amostra, como no processo de coar o café.

Durante a extração podem ocorrer várias situações, como a não-extração de nenhum componente (implica a insuficiência do poder de solvatação do líquido no estado supercrítico para solubilizar as substâncias ou de romper a interação da substância com a matriz), ou somente de outras substâncias, ou dos componentes de interesse associados a outras substâncias. Situação na qual se extrai somente a substância de interesse é raramente obtida. A situação mais realística é

aquela em que ambos os componentes (substância de interesse e interferentes) são extraídos.

A água frequentemente causa problema na extração, especialmente de substâncias polares, e esta pode ser facilitada pela adição de material estranho, que tanto pode aumentar a extração do componente desejado como inibir a extração de interferentes. Os procedimentos utilizados para a remoção da umidade, como secagem em estufa e liofilização, aumentam os riscos de perda de voláteis ou de substâncias termicamente sensíveis. A adição de agentes de secagem como Na₂SO₄ ou MgSO₄ diretamente no extrator contorna o problema da umidade, mas pode causar o entupimento do restritor ou do vaso extrator. Prefere-se o uso de celite e de terras diatomáceas, que funcionam como secadores, além de agentes de dispersão.

O CO₂ puro não é um solvente apropriado para extrair substâncias polares, além de ser ineficiente para romper a forte interação entre a matriz e a substância de interesse. O procedimento utilizado para esses casos tem sido a adição de pequenas quantidades de um solvente orgânico, como metanol ou tolueno, ao CO₂ ou à amostra. Modificadores utilizados com o intuito de aumentar o poder de solvatação do CO₂ devem ser empregados somente em último caso, devido à menor eficiência no mecanismo de retenção. Como regra geral, se a substância se encontra fortemente ligada à matriz, é necessário alto poder de solvatação ou alta temperatura. Portanto, as considerações experimentais devem ser exploradas na seguinte ordem: *aumentar a densidade do CO₂, aumentar a velocidade do fluxo, aumentar a temperatura de extração e, finalmente, adicionar o modificador.*

Como solvente, o dióxido de carbono tende a ser seletivo para as moléculas lipofílicas de baixo peso molecular (abaixo de 500). Geralmente a solubilidade diminui com o aumento do PM dentro de uma série homóloga e com a adição de grupos polares, como hidroxila, carboxila ou nitrogênio. Alguma seletividade dentro dessa faixa pode ser obtida controlando-se a temperatura e a pressão do solvente, ou seja, explorando as diferenças no PM e na pressão de vapor do soluto.

Para se obter sucesso na extração, o soluto precisa ser suficientemente solúvel no fluido supercrítico. A solubilidade depende da natureza química do fluido, da sua densidade durante a extração e da

temperatura. Aumentando-se a temperatura à pressão constante, ocorre a redução da densidade, e o efeito obtido pode ser a redução na solubilidade, que é determinada por dois efeitos: volatilidade e solvatação do fluido que é dependente da sua densidade. Portanto, o efeito de solvatação do fluido diminui com o aumento da temperatura, ao passo que a volatilidade do analito aumenta. Como resultado, a solubilidade de uma substância no fluido supercrítico em pressão constante inicialmente diminui com a temperatura em razão do efeito dominante da densidade e atinge o mínimo; posteriormente, ela aumenta, devido ao efeito da volatilidade. Em espécies relativamente não-voláteis, o aumento da temperatura em pressão fixa do fluido resulta na redução de sua densidade e na solubilidade do analito no fluido, reduzindo a eficiência da extração.

A extração com fluido supercrítico baseia-se no controle da solubilidade via manipulação da temperatura e pressão. A solubilidade de determinado soluto tende a aumentar com a temperatura e pressão de operação. Os limites práticos de cada parâmetro, todavia, são governados por diferentes fatores. A temperatura deve ser mantida abaixo do nível em que o material a ser extraído começa a sofrer degradação térmica; já a pressão está mais relacionada com considerações econômicas, como custo e operação.

A temperatura e a pressão são os dois parâmetros físicos mais importantes na extração supercrítica; juntas, elas definem a densidade do fluido. A densidade máxima de extração do fluido é obtida em pressão elevada e temperatura próxima da temperatura crítica do fluido. A solubilidade de determinada substância no fluido supercrítico é afetada por dois fatores: a volatilidade da substância e o efeito solvente (relacionado com a densidade) do fluido supercrítico. Isso significa que a elevação da temperatura do fluido faz com que aumente a solubilidade de compostos com pressão de vapor significativa, ou seja, a elevação da temperatura à pressão constante geralmente aumenta a solubilidade do analito, que possui suficiente pressão de vapor. Entretanto, a solubilidade de substâncias orgânicas que não apresentem suficiente pressão de vapor provavelmente diminuirá em temperatura elevada, devido à queda da densidade do CO_2 .

A relação existente entre os efeitos da pressão de vapor, que aumenta com a temperatura, e os da densidade do solvente, que diminui com a temperatura, resulta na redução da solubilidade. Esse

comportamento retrógrado é uma manifestação da predominância do efeito da densidade, que é muito sensível à temperatura nessas condições.

A extração com fluido supercrítico funciona de forma semelhante à extração com solventes. O CO₂ supercrítico é utilizado como solvente de extração em substituição aos líquidos comumente utilizados: *cloreto de metileno, hexano, metanol etc.*, sem causar danos às propriedades funcionais de proteínas e de outros constituintes do alimento.

Tal como na extração convencional, a amostra a ser extraída é exposta ao CO₂-supercrítico, que dissolve e remove alguns componentes da amostra original. Este se comporta como *híbrido* de gás e líquido – possui propriedade física (*transporte*) de um gás e química (*solvente*) de um líquido.

A sua alta densidade próxima de líquidos permite grande capacidade de solvatação, enquanto sua baixa viscosidade e alta difusividade conferem-lhe alto poder de penetração e maior e mais rápida transferência de massa do soluto para o fluido supercrítico.

Nas condições de extração, o fluido se movimenta continuamente pela amostra, dissolvendo e removendo os componentes. A separação dos componentes extraídos é obtida pela redução da densidade através da diminuição da pressão em temperatura constante ou pelo aumento da temperatura em pressão constante ou, ainda, pela combinação destas. A expansão da solução na região coletora separa o gás CO₂ expandido dos componentes extraídos. Portanto, essa técnica combina características de extração e destilação simultaneamente.

Extração convencional

Utiliza-se de solventes para extrair diferentes compostos. O preparo de uma xícara de chá, por exemplo, é um processo familiar de extração *líquido-sólido*. Coloca-se o saquinho de chá na xícara e, posteriormente, adiciona-se água quente. Após deixar em repouso por certo tempo, as substâncias solúveis da folha são transferidas para a água. Em laboratório, para fazer a mesma extração, utiliza-se o *extrator de Soxhlet*. O tempo médio de extração com a utilização do Soxhlet varia de 1 a 72 horas, produzindo elevada quantidade de solventes, os quais necessitam ser removidos posteriormente. Nas condições de extração (*solvente e*

temperatura de extração), a integridade dos componentes extraídos pode ser afetada pela decomposição térmica ou pela reação com o solvente.

Outra forma de extração empregada é a *líquido-líquido*, na qual ambos os elementos são líquidos, mas não se dissolvem entre si. Para esse caso, o funil de separação (Figura 18.3) é comumente utilizado. Diferentes solventes são utilizados na extração líquido-líquido. Hidrocarbonetos como o hexano são ótimos para extração de substâncias não-polares, e o benzeno e o tolueno, de substâncias aromáticas; metanol e outros são úteis para extração de compostos polares. É válido ressaltar que nenhum solvente isoladamente funciona bem para todas as amostras.



Figura 18.3 - Extração líquido-líquido.

Algumas considerações gerais relacionadas com os processos convencionais de extração podem ser assim resumidas:

- Utilização de grandes quantidades de solventes, tornando necessária a sua posterior remoção.
- O excesso de solvente é descartado, trazendo problemas ambientais, além de seu custo elevado.
- A extração não é seletiva, e geralmente outros processos subsequentes de purificação (cromatografia) do extrato são necessários.
- O tempo de extração é longo, e algumas substâncias podem ser degradadas pela exposição prolongada no solvente aquecido.

uso de grande volume de solventes, bem como a etapa posterior de concentração.

O CO_2 -supercrítico é essencialmente um solvente não-polar, e seu poder solvente varia consideravelmente com a densidade. Portanto, permite extrair grande variedade de substâncias, dependendo da pressão aplicada. Pode-se ainda fracionar a amostra, extraindo-a em duas ou mais densidades diferentes; portanto, a pressão é um modo efetivo de controle. O CO_2 é menos efetivo em alta temperatura, mas esta, por si só, aumenta o seu poder solvente. Assim, estão disponíveis duas formas de controle da extração.

- Dióxido de Carbono como Solvente

Por diversas razões (baixa toxidez, não-polvente, inerte, temperatura crítica moderada e disponibilidade), o gás carbônico tornou-se uma escolha atrativa.

Produtos de origem biológica são freqüentemente termossensíveis, lipofílicos e não-voláteis, requerendo, portanto, o processamento em temperatura ambiente. O dióxido de carbono possui temperatura crítica de $31,1^\circ\text{C}$, o que o torna atrativo para uso em processamento de alimento e de material biológico. O seu poder solvente é bastante próximo ao do hexano.

Pela manipulação da densidade, pode-se ajustar a solubilidade de forma a obter melhor extração dos componentes da amostra. A faixa do poder solvente do CO_2 -supercrítico disponível com a manipulação da densidade e da temperatura não é, em certos casos, suficiente para algumas extrações. Nesse caso, modificadores químicos para alterar as propriedades solventes podem ser utilizados, como acetona, metanol e cloreto de metileno. Essas modificadores são adicionados à amostra em pequena quantidade, tornando-se possível combinar a propriedade solvente do CO_2 com a natureza polar dos modificadores adicionados, da seguinte maneira:

- Modificadores (solventes orgânicos) são adicionados ao CO_2 ou à amostra quando o gás carbônico, na sua forma pura, não extrai satisfatoriamente os componentes de interesse, dentro da sua faixa de operação (densidade = 0,15-0,95 g/ml). Por exemplo, se o componente a

ser extraído é altamente polar, este será insuficientemente insolúvel no CO_2 . A adição de pequenas quantidades de metanol ou acetona aumenta significativamente sua habilidade para solvatar substâncias polares.

- Os componentes podem ser solúveis no CO_2 , mas estão fortemente ligados à matriz (sítios ativos), de forma que o CO_2 não consegue solubilizá-los, não promovendo assim a sua extração. A interação da matriz com o solvente e a substância a ser extraída exerce forte influência no processo de extração e tem de ser considerada na seleção de modificadores.

- A solubilidade do solvente pode ser modificada por qualquer contaminante extraído da matriz. A presença de água afeta a extração, não pela influência na solubilidade do CO_2 (água é imiscível com o CO_2 -supercrítico). A água ajuda na solubilização de compostos polares, competindo pelos sítios polares da matriz. No entanto, a água pode dificultar a extração de compostos não-polares, atuando como barreira à penetração do dióxido de carbono.

- Os componentes podem ser solúveis no CO_2 , porém estão fisicamente encapsulados. Neste caso, será necessário promover a ruptura física da matriz (ultra-som, agitação em alta velocidade, moagem etc.), para a permitir o contato do solvente.

A utilização dos modificadores pode ser direcionada para cada uma dessas situações. Como regra, sabendo-se que a solubilidade do CO_2 é muito próxima da do hexano (não-polar), o poder solvente resultante da mistura *modificador/ CO_2* pode ser alterado de maneira análoga à da mistura de solventes, como no processo convencional de extração.

A introdução de co-solventes no CO_2 -SC altera a polaridade e o poder de solvatação do CO_2 -SC. Por exemplo, na extração de substâncias polares, é necessário adicionar modificadores polares. Isso resulta em aumento significativo na temperatura crítica da mistura. Exemplificando, no caso do metanol, a temperatura crítica para misturas contendo 0, 5, 10, 15, 20 e 25% de metanol em CO_2 é de 31, 49, 65, 80, 95 e 107 °C, respectivamente. Como consequência, temperaturas elevadas de operação são requeridas, resultando na diminuição da densidade do fluido.

Extração analítica

Os parâmetros densidade, pressão e temperatura controlam o poder de solvatação do CO_2 -supercrítico; portanto, com a manipulação destes, pode-se fracionar a amostra. A quantidade de soluto dissolvido no fluido varia com a sua densidade.

O poder solvente é selecionado escolhendo-se a temperatura e a pressão que forneçam a densidade desejada: acima da temperatura crítica, o poder solvente é ajustado pela densidade, o limite máximo do poder solvente se aproxima da alta densidade e muito pouco ganho na densidade se verifica pelo aumento da pressão.

O sistema de extração com CO_2 -supercrítico consiste de quatro componentes básicos: bomba, extrator, sistema de controle da temperatura e pressão e separador ou adsorvente (Figura 18.4).

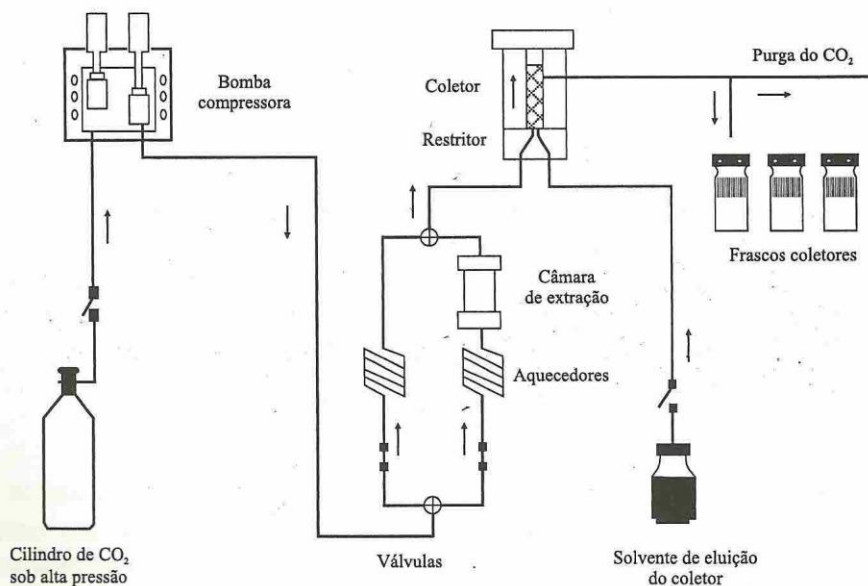


Figura 18.4 - Sistema de extração analítica com CO_2 -SC. (HP 7680).

O CO_2 líquido armazenado no cilindro é conduzido à bomba para ser comprimido na pressão desejada. Antes do contato com a amostra, o

fluido é aquecido (zona de aquecimento) em temperatura preestabelecida. Sistemas de válvulas permitem a extração de duas maneiras: *estática* (equilíbrio) ou *dinâmica*.

No modo estático, quantidade fixa do fluido é mantida em contato com a amostra na densidade (pressão), temperatura e composição desejadas por determinado tempo. No processo dinâmico, o fluido de extração é mantido na densidade (pressão), temperatura e composição desejadas, passando continuamente pela amostra à velocidade previamente selecionada. Com o contato e a passagem do fluido pela amostra, esta é dissolvida e arrasta alguns de seus componentes.

- Fluxo e tempo de extração

Na escolha do fluxo de CO₂ a ser utilizado em determinada extração, deve-se levar em consideração a relação entre a densidade e a velocidade de transporte do solvente. Geralmente, aumentando-se a densidade do CO₂, ocorre a diminuição do fluxo pelo aumento do número de moléculas/unidade de volume. Ao ignorar essa relação, o resultado será a incompleta recuperação dos componentes extraídos.

A extração completa de determinado componente requer que volumes variáveis de CO₂ (de 3 a 10) passem pelo cartucho ou pela câmara de extração contendo a amostra. Por exemplo, utilizando-se um cartucho de capacidade de 7,0 ml e o dióxido de carbono bombeado à velocidade de 1,0 ml/min, à densidade de 0,25 g/ml, o tempo de extração de 10 min será suficiente para lavar o cartucho três vezes. Se a densidade do dióxido de carbono for alterada para 1,0 g/ml e se o mesmo fluxo for mantido, o tempo necessário para lavar o cartucho será de 7 min; portanto, o tempo de extração de 10 min será suficiente para lavar 1,3 vez o cartucho contendo a amostra, podendo não ocorrer completa recuperação dos componentes extraídos.

De outra forma, o volume de CO₂ gasto pode ser calculado, considerando-se as seguintes pressuposições:

- Capacidade do cartucho = 7,0 ml.
- Fluxo = 1,0 ml/min.
- Densidade = 0,46 g/ml.
- Tempo de extração = 10 min.

$$\text{Vol. CO}_2 = (1,0 \text{ ml/min})(0,92/0,46 \text{ g/ml})(10 \text{ min}) = 20 \text{ ml.}$$

$$\text{Volume CO}_2/\text{volume cartucho (20/7,0)} = 2,85 \text{ vezes.}$$

Fluxo de CO₂ mais elevado pode ser usado para dissolver e remover solutos altamente solúveis e de fácil acesso. Em contraste, fluxo mais baixo deve ser usado para amostra contendo os componentes encapsulados ou ligados.

- Expansão

Na sequência da extração (Figura 18.4), a mistura contendo os componentes extraídos é direcionada para o restritor, onde ocorre a expansão, i.e., a densidade do fluido de extração muda de líquido para gás. No processo dinâmico, a extração e expansão ocorrem simultaneamente. De um lado do restritor, a pressão é mantida elevada e, do outro, a pressão é ambiente, ocorrendo, portanto, a queda da pressão. Com a diminuição da pressão, a densidade da solução também diminui e os componentes extraídos se separam da solução, colidindo entre si. O processo de expansão resfria o restritor, de forma que é necessário haver um sistema de controle da temperatura para manter o processo de expansão ininterrupto.

- Coleta

Os componentes extraídos são coletados em superfície sólida. Esses coletores são constituídos de material poroso, que possui afinidade química com o material extraído (ODS, PORAPAK etc.), ou esfera de aço, que atuam como filtros químico, mecânico e térmico para separar os componentes extraídos do gás expandido. Os componentes retidos são reconstituídos pela lavagem com solventes apropriados.

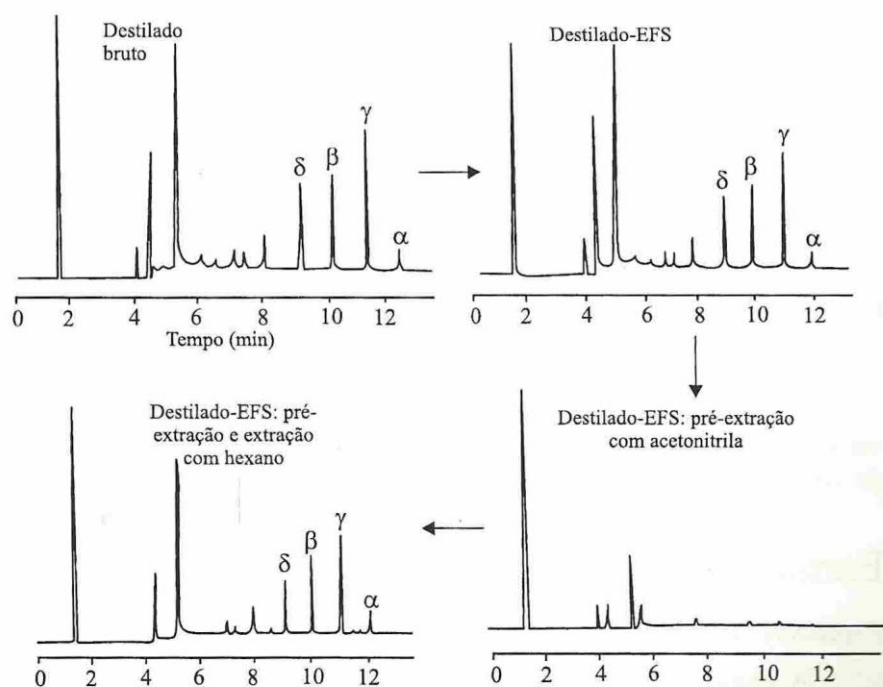
Os parâmetros de lavagem mais apropriados podem ser selecionados (temperatura, fluxo do solvente e composição). Quanto mais volátil o componente na região coletora, maior é a sua tendência de vaporizar, podendo ser removido da zona de coleta juntamente com o gás expandido. Parâmetros como *temperatura e atração química* são empregados para minorar a vaporização.

Quando o fluido de extração contém modificadores e a temperatura da região coletora é mais fria que o ponto de fusão, ocorrem a

condensação e precipitação. Por outro lado, se a região coletora é mantida em temperatura acima do ponto de ebulição do modificador, ocorre a vaporização, e este é eliminado juntamente com o gás.

Durante o processo de extração, o controle da pressão, temperatura, composição química e do fluxo é importante. O controle correto da temperatura do restritor e da região coletora mantém o fluxo contínuo. Entretanto, é necessária, durante a etapa de coleta, alguma forma de atração química que garanta completa recuperação da amostra.

A figura a seguir ilustra, com cromatogramas, o resultado obtido da extração de tocoferóis do destilado desodorizado do óleo de soja, utilizando-se o dióxido de carbono como solvente.



Processo simplificado de extração comercial

A amostra é colocada no extrator equipado com controladores de temperatura e pressão para manter as condições de extração desejada. O tanque de extração é pressurizado com o fluido, com o auxílio de bomba.

Os componentes solubilizados são transferidos para o(s) separador(es) e, nesse local, ocorre a diminuição do poder de solvatação do fluido, aumentando a temperatura ou diminuindo a pressão do sistema. Nessa etapa, o produto é então coletado por meio de válvulas localizadas na parte inferior do(s) separador(es) (Figura 18.5).

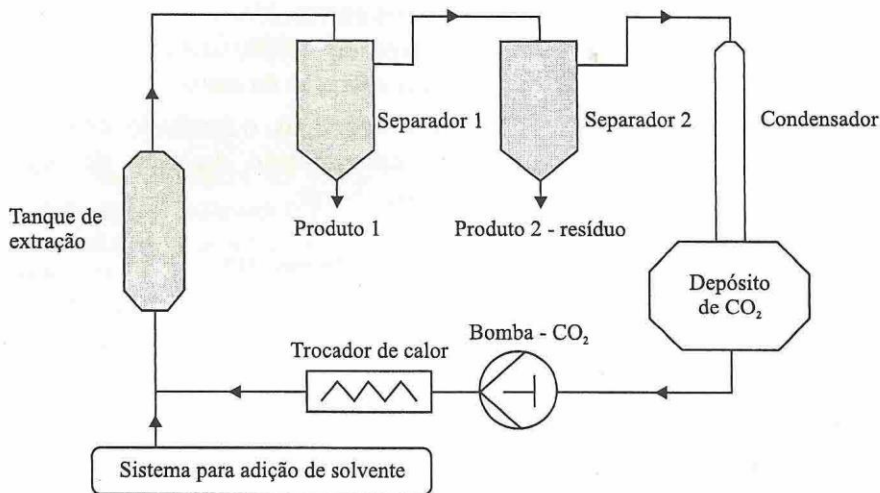


Figura 18.5 - Diagrama simplificado do extrator supercrítico.

O volume médio dos extratores utilizados em escala comercial varia de 200 a 2.000 L. Até o presente, a quantidade de extratores acima de 100 L, em operação no mundo, é em torno de 130.

Extração de Pigmentos do Pimentão

Procedimento

A extração do pigmento será realizada conforme metodologia a seguir, utilizando-se o extrator modelo HP 7680.

- Pesar 10,0 mg do pimentão seco e transferir para o extrator. Proceder à extração, utilizando-se três diferentes densidades (0,25, 0,65 e 0,95 g/ml), conforme indicado a seguir:

Condições de extração

Parâmetros		Valores	
Amostra		10,0 mg	
Coletor		aço inox	
Condições de extração	1 ^a	2 ^a	3 ^a
Densidade	0,25	0,65	0,95 g/ml
Pressão	77	104	383 bars
Temperatura	40	40	40 °C
Tempo estático	0,5	0,5	0,5 min
Tempo de extração dinâmica	4	4	5 min
Fluxo de CO ₂	1,0	2,4	2,9 ml/min
Temperatura do restritor	45	45	45 °C
Condição de reconstituição			
Solvente		Acetonitrila	
Temperatura do coletor		40 °C	
Volume de reconstituição		2 x 1,0 ml	

Cromatografia de fase gasosa do extrato

Analisar as três frações obtidas em:

- Coluna capilar de sílica, fase estacionária metil silicone (25 m x 0,2 mm x 0,33 µm).
- Temperatura da coluna:
inicial: 100 °C/2,0 min.
final: 300 °C/5,0 min (gradiente de 20°C/min).
- Temperatura do detector de ionização de chama: 300 °C.
- Temperatura do injetor: 250 °C.

Extração da Capsaicina de Pimenta

Capsaicina é uma amida com unidades isoprenóides (Capítulo 5), responsável pelo sabor pungente em pimenta, detectada sensorialmente em níveis de 10 ppm.

O método tradicional de extração da oleorresina utiliza álcool etílico saturado com acetato de sódio em temperatura de 60 °C/2 horas. O binômio tempo/temperatura utilizado na extração altera a integridade da amostra em razão das condições oxidantes nela existentes.

A extração com CO₂-SC, além do tempo de extração em menos de 25 min, oferece vantagens significativas sobre o processo tradicional, pois a temperatura baixa de extração, aliada à condição não-oxidante, garante a integridade do extrato final.

No preparo da amostra, o etanol é adicionado com o propósito de solvatar a capsaicina, facilitando sua extração:

Condições de extração

Parâmetros	Valores
Amostra**	0,5 g
Coletor	ODS
Condições de extração	
Densidade	0,70 g/ml
Pressão	115 bar (1670 psi)
Temperatura	40 °C
Tempo estático	15 min
Tempo de extração dinâmica	10 min
Fluxo de CO ₂	2,5 ml/min
Temperatura do coletor	5-10 °C
Condição de reconstituição	
Solvente	Fase móvel (CLAD)
Temperatura do coletor	30 °C
Volume de reconstituição	1,0 ml

** Triturar 100 g da amostra, pesar 500 mg e homogeneizar com 0,5-1,0 g de ETOH.

Extração da Vitamina E

Os tocoferóis (vitamina E) são compostos lipossolúveis encontrados quase que exclusivamente nos tecidos vegetais e, somente em pequenas concentrações, nos tecidos animais.

O método tradicional de extração (destilação molecular) baseia-se na diferença de peso molecular dos componentes a serem separados. Consiste em passar a amostra através de um trocador de calor em temperatura próxima de 200 a 210 °C, sob condição de alto vácuo.

A extração com o CO₂- SC é uma alternativa altamente desejável para se substituir a extração convencional, como a extração líquido-líquido, destilação e adsorção.

Condições de extração

Parâmetros		Valores
Amostra*		20 µl
Coletor		ODS
Condições de extração	Pré-extração	Extração
Densidade	0,15 g/ml	0,78 g/ml
Pressão	76 bar	197 bar
Temperatura do extrator	80 °C	50 °C
Tempo de extração dinâmica	8 min	25 min
Fluxo de CO ₂	3 ml/min	3 ml/min
Temperatura do coletor	20 °C	20 °C
Temperatura do restritor	55 °C	55 °C
Condição de reconstituição		
Solvente	Acetonitrila	Hexano
Volume de reconstituição	1,8 ml	1,8 ml
Fluxo	2 ml/min	2 ml/min
Temperatura do coletor	20 °C	60 °C

*Destilado desodorizado do óleo de soja.

Cromatografia de fase gasosa do extrato

- Coluna capilar de sílica, fase estacionária metil silicone (25 m x 0,2 mm x 0,33 µm).
- Temperatura da coluna:
 - inicial: 200 °C/1 min.
 - final: 300 °C/10 min (gradiente de 20 °C/min).
- Temperatura do injetor: 250 °C.
- Temperatura do detector de ionização de chama: 300 °C.

Remoção do Limoneno do Óleo Essencial de Limão

No processamento de limão, o óleo essencial é considerado o produto principal, sendo removido da casca durante a extração do suco e utilizado pelas indústrias alimentícias, farmacêuticas e químicas. É constituído de uma mistura de hidrocarbonetos do grupo de terpenos e sesquiterpenos e de compostos oxigenados (Capítulo 5). O limoneno é o principal constituinte do óleo essencial (60 a 75% do total). Além de contribuir muito pouco para o aroma, é sensível à oxidação, dando origem a produtos indesejáveis.

As técnicas tradicionalmente utilizadas para remoção parcial de terpenos (desterpenação) levam a resultados pouco satisfatórios, seja por provocarem degradação térmica dos compostos, seja pela presença de quantidades residuais de solventes no produto final ou pelos baixos rendimentos obtidos.

Condições de extração

Parâmetros	Valores
Amostra*	20 μ l
Coletor	ODS
Condições de extração	
Densidade	0,35 g/ml
Pressão	120 bar
Temperatura	70 °C
Tempo de extração dinâmica	6 min
Fluxo de CO ₂	1 ml/min
Temperatura do coletor	0 °C
Condição de reconstituição	
Solvente	Hexano
Temperatura do coletor	50 °C
Volume de reconstituição	2x1 ml

* Adsorvido em 100 mg de sílica-gel.

Cromatografia de fase gasosa

- Coluna capilar de sílica, fase estacionária metil silicone (25 m x 0,2 mm x 0,33 μm).
- Temperatura da coluna:
inicial: 75 °C/30 seg. e final: 220 °C/4 °C/min.
- Temperatura do injetor: 200 °C.
- Temperatura do detector de ionização de chama: 250 °C.

Extração do Óleo de Café Verde

O café arábica contém maior quantidade de óleo que o robusta, variando de 10,5 a 17,7% e de 8 a 10%, respectivamente. Em relação à composição, o óleo de café possui menor quantidade de compostos saponificáveis que os óleos comestíveis e geralmente não mais que 80% de triglicerídeo, composto principalmente de ácido palmítico e linoléico, com teores de aproximadamente 35% e 42%, respectivamente. Em contrapartida, a quantidade de compostos insaponificáveis é bastante elevada, podendo chegar a 12% ou mais. Essa fração é rica em diterpenos caveol e cafestol (Figura 18.6), encontrados na forma livre e esterificados com ácidos graxos, principalmente palmítico, esteárico e linoléico. O café arábica possui quantidade maior de diterpenos que o robusta. Essa composição peculiar do óleo de café verde torna-o valioso para a indústria de cosméticos, em razão das suas propriedades amaciantes, emolientes e hidratantes, além da capacidade de bloquear a radiação solar (280-320 nm).

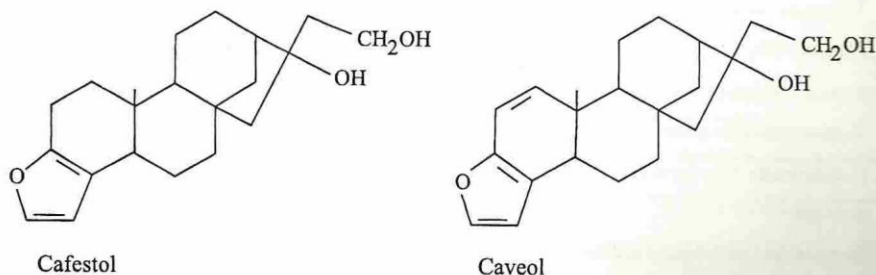


Figura 18.6 - Estruturas químicas do cafestol e caveol.

A presença do cafestol e do caveol no óleo afeta a sua estabilidade à oxidação e diminui a sua qualidade sensorial. Adicionalmente, a presença deles no óleo de café torrado (~1,0%) tem sido considerada responsável pela elevação do colesterol em consumidores de café que não utilizam o filtro de papel na obtenção da bebida, como o café expresso (elevado teor de diterpenos presentes no óleo). No caso do café torrado, os elevados teores de compostos voláteis que proporcionam o seu sabor e aroma são encontrados principalmente no óleo. Por isso, é utilizado na indústria de alimentos como fonte de aroma.

As quantidades no grão verde variam de 1,3 a 1,9% e de 0,2 a 1,5%, respectivamente. Em relação ao óleo (café arábica), a quantidade de cafestol e de caveol encontrada foi de 533,7 mg.100 g⁻¹ e 619,2 mg.100 g⁻¹, respectivamente.

Condições de extração:

- umidade do grão: ~10%
- granulometria: 0,297 a 0,35

Parâmetros	Valores
Amostra	200 mg
Coletor	ODS
Condições de extração	
Densidade	0,77 g.mL ⁻¹
Pressão	373 bar
Temperatura de extração	90 °C
Tempo de extração dinâmica	20 min
Fluxo de CO ₂	1,5 mL.min ⁻¹
Temperatura do restritor	70 °C
Temperatura do coletor	35 °C
Condições de reconstituição	
Solvente	Hexano
Temperatura do coletor e restritor	58 °C
Volume de reconstituição	2,0 mL

Em relação ao teor de diterpenos, obtém-se uma redução de 47% nos teores de cafestol e caveol no óleo extraído.

Extração do óleo do café torrado – Este óleo é utilizado como aromatizante em vários alimentos e bebidas industrializados. Pode ser obtido tanto por prensagem dos grãos ou por solventes, como o hexano. A extração por solvente é indesejável, em relação à qualidade do produto final, e o rendimento na extração por prensagem é geralmente muito baixo. A torrefação não afeta a quantidade absoluta do óleo, entretanto a perda de umidade aumenta o teor relativo. É utilizado na fabricação de café instantâneo, adicionado no final do processo para compensar as perdas dos compostos voláteis ocorridas na sua obtenção. Uma característica indesejável no óleo, no entanto, são os diterpenos cafestol e caveol presentes na fração insaponificável. Além de comprometerem a estabilidade do óleo, eles têm sido associados ao aumento nas taxas de colesterol. A qualidade sensorial do óleo livre de diterpenos é considerada melhor que a do óleo bruto. Os valores dos diterpenos cafestol e caveol encontrados foram de 432,1 mg.100g⁻¹ e 572,3 mg.100g⁻¹, respectivamente.

Condições de extração

umidade do grão - ~2,4%

granulometria : 0,297 a 0,35

Parâmetros	Valores
Amostra	200 mg
Coletor	ODS
Condições de extração	
Densidade	0,84 g.mL ⁻¹
Pressão	371 bar
Temperatura de extração	70 °C
Tempo de extração dinâmica	20 min
Fluxo de CO ₂	2,0 mL.min ⁻¹
Temperatura do restritor	70 °C
Temperatura do coletor	35 °C
Condições de reconstituição	
Solvente	Hexano
Temperatura do coletor e restritor	58 °C
Volume de reconstituição	2,0 mL

Nessas condições houve redução do teor de diterpenos no óleo, representando uma queda de 71% em relação aos teores desses componentes determinados no óleo extraído com solvente, aumentando significativamente a sua estabilidade e qualidade sensorial.

Cromatografia líquida de alto desempenho do extrato

Os diterpenos cafestol e caveol foram determinados por cromatografia líquida de alto desempenho, equipados com duas colunas HP- C_{18} (200 mm x 4,6 mm x 5,0 μ m) conectadas em série e detector de UV-VIS a 220 nm, utilizando-se como fase móvel a mistura metanol / água (85: 15%, v/v) e fluxo de 0,7 mL.min⁻¹. O tempo de retenção do caveol é de 13 minutos, e o do cafestol, 14.

A amostra do óleo (50 mg) foi saponificada com 3 mL de uma solução de KOH 0,5 mol.L⁻¹ em metanol. A fração insaponificável foi extraída da fração saponificada com hexano (3 x 2 mL) e lavada com 1 mL de água (três vezes) para a remoção de resíduos de sabão. A fração orgânica foi concentrada em nitrogênio a 45 °C e ressuspensa em 1,0 mL de fase móvel. A amostra deve ser filtrada em filtros de celulose de 0,45 μ m, injetando-se 50 μ L no cromatógrafo.

Extração da Cafeína

O teor de cafeína é de 1,2-2,0%. Este alcalóide não possui sabor, é moderadamente solúvel em água e pode ser extraído do grão verde ou torrado, com solventes menos polares.

O processo utilizado industrialmente na extração da cafeína do grão de café envolve a utilização de solvente orgânico ou do dióxido de carbono. No café verde, a cafeína se encontra ligada ao ácido clorogênico, e, para que ocorra a sua remoção, é necessário inicialmente que o teor de umidade do grão seja elevado, o que é feito deixando-se os grãos em repouso em água aquecida. Posteriormente, os grãos são removidos e é adicionado o solvente acetato de etila (componente natural presente no aroma do café e encontrado em frutas) na proporção de 1 parte de café: 5 partes do solvente. A última etapa dessa operação é submeter os grãos a temperatura elevada para remover o excesso de umidade e resíduo do solvente. A remoção da cafeína e de sólidos

solúveis por esse processo varia de 37 a 80% e de 9 a 42%, respectivamente, dependendo da temperatura de extração.

O processo mais seletivo para se remover a cafeína e não outros componentes precursores do aroma do café é a utilização do dióxido de carbono supercrítico. Inicialmente, aumenta-se a umidade dos grãos utilizando a água (umidade ~50%), em pressão de 300 bar a 60 °C.¹⁹⁶

REFERÊNCIAS

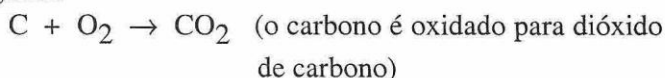
- CELIKITAS, O.; BEDIR, E.; SUKAN, V. In vitro antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1457-1464, 2007.
- GOPALAKRISHNAN, N. Carbon dioxide extraction of coffee beans. **Indian Coffee**, v. 54, p. 7-9, 1990.
- JARVEPAA, M. S.; HIETANIEMI, V. Advances in supercritical carbon dioxide technologies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 217-222, 1999.
- JULIO, M. A. A.; DELCIO, S. Extraction of coffee diterpenes and coffee oil using supercritical carbon dioxide. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1087-1094, 2007.
- KING, J.W.; LIST, G. R. **Supercritical fluid technology in oil and lipid chemistry**. Champaign, Illinois: AOAC Press, 1996. 435 p.
- PALMER, M.; TING, S. S. T. Application for supercritical fluid technology in food processing. **Food Chemistry**, v. 52, p. 345-352, 1995.
- McHUGH, M.; KRUKONIS, V. **Supercritical fluid extraction: principles and practice**. 2. ed. London: Butterworth-Heinemann, 1994. 512 p.
- ROSTAGNO, M. A.; ARAUJO, J. M. A.; SANDY, D. Supercritical fluid extraction of isoflavone from soybean flour. **Food Chemistry**, v. 78, p. 111-117, 2002.
- RIZVI, S. S. H. **Supercritical fluid processing of food and biomaterials**. New York: Chapman Hall, 1994. 257 p.
- QUANCHENG, Z.; GUIHUA, S.; HONG, J. Concentration of tocopherols by supercritical carbon dioxide with cosolvents. **Eur. Food Res. Technology**, v. 219, p. 398-402, 2004.

APÊNDICES

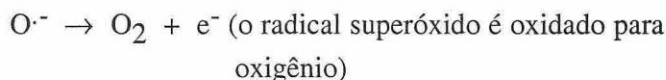
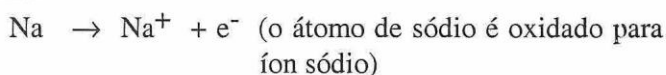
APÊNDICE 1 – AGENTE OXIDANTE E REDUTOR

Agente oxidante: promove a oxidação de outra molécula pela remoção de elétrons ou hidrogênio ou pela adição de oxigênio.

1 - Ganho de oxigênio:

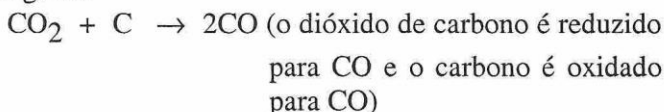


2 - Perda de elétrons:

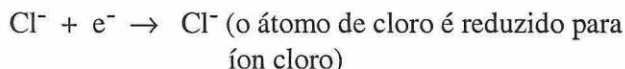
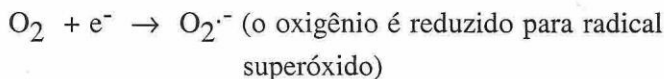
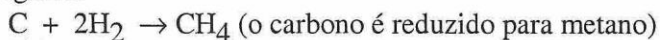


Agente redutor: promove a redução de outra molécula doando elétrons ou hidrogênio ou removendo o oxigênio.

1 - Remoção do oxigênio:



2 - Ganho de hidrogênio:



APÊNDICE 2 – UNIDADES DE MASSA E COMPRIMENTO

Massa

$$\begin{aligned} 1 \text{ d\AA}lton &= \text{massa de um \AA}tomo de hidrog\AA{nio} \\ &= 1,67 \times 10^{-24} \text{ g} \end{aligned}$$

$$1 \text{ picograma} = 1,0 \times 10^{-12} \text{ g}$$

Comprimento

$$\begin{aligned} 1 \text{ nan\AA}metro \text{ (nm)} &= 10^{-9} \text{ m} \\ &= 10 \text{ \AA}ngstr\AA{on} \text{ (\AA)} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 1 \text{ micr\AA}metro \text{ (\AA}m) &= 10^{-6} \text{ m} \\ &= 1.000 \text{ nm} \\ &= 10.000 \text{ \AA} \end{aligned}$$

APÊNDICE 3 – LIGAÇÕES RESPONSÁVEIS PELA ESTABILIDADE DA PROTEÍNA

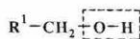
1	interação eletrostática			ponte salina
		$\text{—CH}_2\text{OH}$	$\text{HOCH}_2\text{—}$	dipolo-dipolo
2	ponte de hidrogênio			íon-dipolo
		—N—H—	—O—C—	amida-carbonila
		—N—H—	—O—H	amida-hidroxila
		—O—H—	—O—C—	hidroxil-carbonila
3	interação hidrofóbica			
4	ligação co-valente	—S—S—		ponte de enxofre
				peptídica

APÊNDICE 4 – INTERAÇÃO ENTRE MOLÉCULAS DE ÁGUA E DE PROTEÍNA

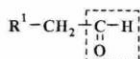
		íon-dipolo
$\text{—CH}_2\text{—O—H}$		dipolo-dipolo
—C=O—		ponte de hidrogênio
—N—H—		

APÊNDICE 5 – GRUPOS FUNCIONAIS CITADOS NO TEXTO

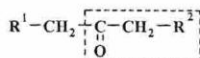
1 - HIDROXILA



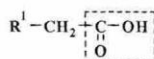
2 - CARBONILA (ALDEÍDO)



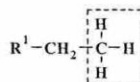
3 - CARBONILA (CETONA)



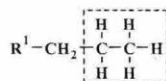
4 - CARBOXILA



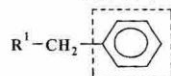
5 - METIL



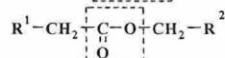
6 - ETIL



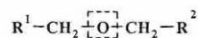
7 - FENIL



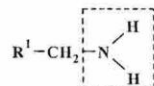
8 - ÉSTER



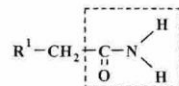
9 - ÉTER



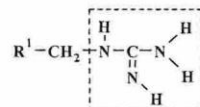
10 - AMINO



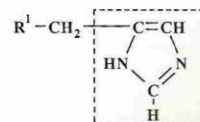
11 - AMIDA



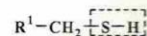
12 - GUANIDINO



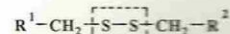
13 - IMIDAZOLE



14 - SULFIDRILA



15 - DISSULFETO



APÊNDICE 6 – ACIDEZ DE FRUTAS

Diversas frutas e produtos derivados apresentam elevada acidez, com $\text{pH} < 4,0$. Os ácidos orgânicos predominantes são o cítrico, o málico e o tartárico. Em geral, as frutas oriundas de regiões de clima frio são mais ácidas que as de regiões quentes.

FRUTA	pH	ÁCIDOS NÃO-VOLÁTEIS
Maçã	3,3 – 4,1	Málico, Cítrico, Lático
Banana	4,5 – 5,2	Cítrico, Málico, Tartárico
Uva	3,0 – 4,5	Tartárico, Málico
Goiaba	3,0 – 3,2	Cítrico, Málico, Lático
Limão	2,2 – 2,4	Cítrico
Manga	3,3 – 3,7	Cítrico, Tartárico
Laranja	3,0 – 4,0	Cítrico, Málico
Mamão	4,5 – 6,0	Cítrico, Málico, Cetoglutárico
Pêssego	3,1 – 4,2	Málico, Cítrico
Pêra	3,4 – 4,7	Málico, Cítrico
Abacaxi	3,2 – 4,0	Cítrico, Málico
Melão	5,8 – 6,0	Cítrico, Málico

APÊNDICE 7 – VALORES APROXIMADOS DE pH EM PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL E VEGETAL

Com base no pH, os alimentos são agrupados como se segue:

- 1 – Muito ácidos (pH < 3,7)
- 2 – Ácidos (pH 3,7 a 4,6)
- 3 – Acidez média (pH 4,6 a 5,3)
- 4 – Pouco ácido (pH > 5,3)

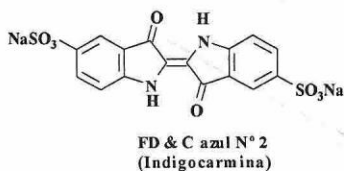
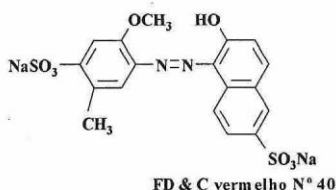
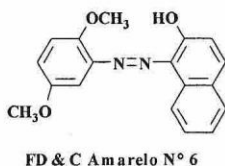
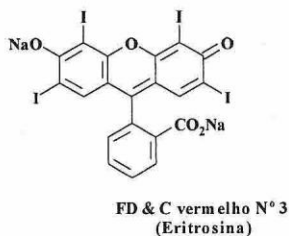
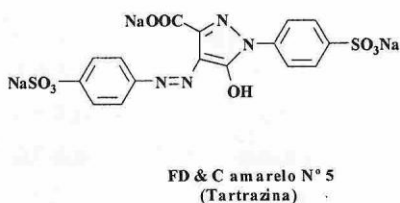
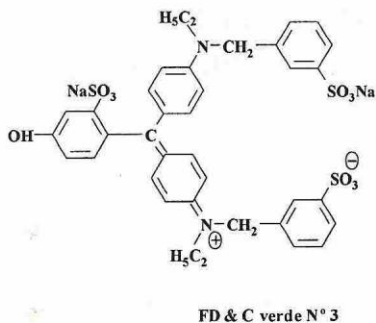
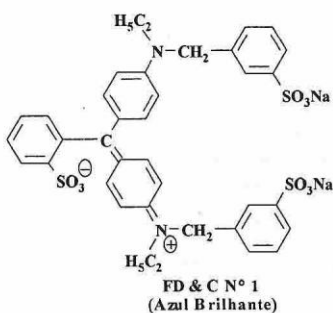
Vegetal	pH	Animal	pH
Aspargo	5,4-5,8	Manteiga	6,1-6,4
Brócolis	5,2-6,5	Crema	4,5
Repolho (verde)	5,4-6,0	Leite	6,3-6,5
Cenoura	4,9-5,2	Queijo	4,9-5,9
Couve-flor	5,6-6,5	Carne de boi (moída)	5,1-6,2
Milho (doce)	7,3	Presunto	5,9-6,1
Pepino	3,8	Carne de frango	6,2-6,4
Berinjela	5,3-5,8	Peixe*	6,6-6,8
Alface	6,0-6,4	Ostra	4,8-6,3
Cebola	5,3-5,8	Camarão	6,8-7,0
Batata	5,3-5,8	Caranguejo	7,0
Batata-doce	5,3-5,6	Lagosta	7,0
Espinafre	5,2-5,6		
Moranga	5,0-5,4		
Ervilha	6,0-6,2		
Tomate	4,2-4,3		

* imediatamente após abate.

APÊNDICE 8 – CORANTES ARTIFICIAIS DE USO PERMITIDO EM ALIMENTOS

LIMITE MÁXIMO: 0,01%, exceto leite aromatizado, fermentado e geleificado (0,005%).

ASSOCIAÇÃO DE CORES: permitido mistura de três cores.



Índice remissivo

A

- Açafrão, 447
Açafrão, 446
Acetildaidzina, 467
Acetilgenistina, 467
Acetilglicina, 467
Ácido acético, 102, 103, 120, 155, 293, 327, 466, 483, 484, 485
Ácido ascórbico, 70, 71, 95, 131, 132, 141, 144, 145, 146, 147, 148, 150, 151, 183, 186, 187, 189, 190, 203, 208, 263, 299, 318, 329, 330, 334, 337, 338, 389, 394, 395, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 409, 413, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 445, 449, 450, 453, 455, 483
Ácido aspártico, 363, 376
Ácido benzóico, 171, 321, 323 324, 325, 326
Ácido caféico, 391
Ácido cianídrico, 288, 289, 451
Ácido cítrico, 104, 126, 132, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 141, 146, 147, 148, 151, 154, 237, 263, 271, 324, 394, 395, 398, 400, 401, 402, 403, 405, 406, 421, 449
Ácido clorogênico, 175, 390, 391, 398, 425, 428, 429, 552, 580
Ácido dicetogulônico, 418
Ácido eritórbico, 131, 146
Ácido fítico, 143, 296, 297, 298
Ácido fosfórico, 74, 75, 132, 148, 263
Ácido gálico, 127, 136, 137, 204, 209
Ácido graxo livre, 24, 61, 80, 84, 97, 98
Ácido láctico, 237, 295, 383
Ácido linoléico conjugado, 192, 193, 194
Ácido nitroso, 334, 335, 336
Ácido p-coumárico, 172
Ácido propiônico, 323, 325
Ácido quínico, 425, 428
Ácido sórbico, 321, 323, 325
Ácido tartárico, 148, 236, 342
Ácido úrico, 64, 166, 168, 189, 203, 204
Ácidos ferrúlico, 431
Ácidos glutâmico, 351, 359
Ácido sinápico, 172
Açúcar redutor, 414, 416, 417, 422, 426
Aflatoxina dihidrodio, 305, 306
Aflatoxina-epóxido, 306, 307, 308
Agentes complexantes, 132, 144, 147, 148, 150, 398
Água oxigenada, 65, 71, 165, 167, 175, 176, 179, 182, 183, 203, 299, 311, 376, 402, 419, 436, 439, 455
Albumina, 169, 251, 266, 383, 384, 477
Alcoxil, 40, 43, 49, 62, 65, 68, 80, 129, 166, 167, 178, 190, 259, 260, 262, 332, 374
Aldeídos, 27, 28, 40, 43, 49, 52, 53, 55, 59, 62, 68, 75, 76, 79, 85, 91, 101, 106, 107, 117, 118, 119, 124, 179, 180, 202, 215, 260, 274, 277, 309, 330, 379, 416, 422, 498, 539, 550, 551
Alecrim, 143, 280, 281, 282
Alquil, 49, 64, 66
Amido, 74, 102, 103, 104, 114, 115, 218, 223, 233, 234, 236, 239, 246, 247, 256, 267, 268, 271, 296, 297, 298, 311, 341, 342, 379, 423, 424, 426, 457
Amilopectina, 247
Amilose, 247, 268, 269
Anidrido nitroso, 335, 337, 338
Ânion superóxido, 62, 63, 64, 66, 71
Antioxidantes, 34, 39, 75, 84, 89, 90, 91, 95, 96, 125, 126, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 135, 137, 139, 141, 143,

144, 145, 146, 148, 151, 152, 153,
154, 155, 157, 159, 164, 166, 168,
169, 170, 171, 174, 180, 181, 183,
187, 188, 189, 190, 191, 201, 202,
203, 204, 207, 261, 262, 263, 264,
265, 280, 282, 329, 398, 400, 415,
445, 447, 449, 450, 470, 478, 479
Antocianinas, 330, 424, 436, 452, 453,
454, 455, 456, 459, 462
Araquidônico, 17, 20, 21, 48
Arginina, 165, 166, 248, 338, 350, 352,
359, 414, 415, 427
Ascorbato oxidase, 299, 396, 397, 399
Asparagina, 85, 350, 352, 423, 425
Atividade da água (a_w), 24, 313, 320, 322,
449

B

β -glicosidase, 480
Benzofurano, 311
Benzopireno, 294, 327
Benzoquinona, 392, 394, 456
Betalaínas, 447, 449, 459
Betaninas, 448
BHA, 84, 127, 128, 130, 133, 134, 135,
136, 137, 138, 140, 141, 144, 148,
151, 152, 154, 155, 156, 158, 159,
202, 447
BHL, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 239,
240, 242, 268, 271
BHT, 84, 121, 127, 128, 130, 133, 134,
135, 136, 137, 138, 140, 148, 151,
152, 158, 202, 447, 540, 543, 544
Biochanina A, 171, 467, 474, 481, 487
Bixina, 444, 445
Branqueamento, 16, 51, 75, 186, 318,
440, 441
Bromato, 51, 267, 408

C

C. Botulinum, 320
Caféina, 425, 426, 429, 542, 555, 560,
580, 581

Cafestol, 425, 428, 577, 578, 579, 580
Capsaicina, 274, 573, 574
Capsantina, 449, 450
Capsorubina, 449
Caramelização, 398, 413, 422, 424, 428,
457
Caramelo, 413, 422, 457, 458
Caroteno, 34, 51, 52, 57, 68, 69, 75, 76,
183, 188, 189, 190, 191, 192, 203, 329
Caseína, 96, 150, 217, 246, 251, 253, 265,
310, 355, 383, 388
Catalase, 164, 165, 166, 168, 170, 171,
176, 180, 181, 183, 184, 185, 187,
188, 191, 318, 320, 334, 399, 402,
408, 435, 436, 438, 442, 478
Catecol, 391, 408, 409, 410, 425, 479
Catequina, 173, 174, 204
Caveol, 428, 577, 578, 579, 580
Cetonas, 27, 28, 40, 52, 75, 76, 78, 79,
101, 215, 260, 277, 330, 498
Chaconina, 292
Cianidina, 204, 453, 456
Ciclamen, 423
Cisteína, 51, 175, 182, 249, 252, 266,
305, 307, 338, 349, 350, 352, 371,
376, 377, 378, 395, 402, 403, 404
Cistina, 249, 266, 311, 350, 352, 365,
366, 371, 377, 427
Citocromo, 41, 166, 168, 176, 178, 332
Cital, 277, 284
Citrulina, 165, 166
Cloro, 222, 402
Clorofila, 27, 34, 36, 37, 51, 57, 74, 75,
76, 100, 318
Clorofilase, 318
Cloroidrina, 328
Coalescência, 218, 228, 233, 256, 257,
258, 259, 260, 264, 265
Cobre, 24, 25, 95, 104, 132, 144, 148,
151, 164, 171, 179, 182, 184, 185,
187, 239, 263, 298, 392, 400, 403,
404, 405, 418, 449, 479
Colesterol, 68, 161, 163, 171, 177, 194,
195, 196, 197, 198, 199, 200, 201,
202, 205, 206, 207, 208, 286, 298,
464, 476, 478, 555, 578, 579
Creatinina, 166

Cresol, 392
Curcumina, 446, 447

D

Daidzeína, 465, 466, 467, 469, 471, 472,
473, 474, 475, 478, 481, 483, 486
Daidzina, 467, 473, 486
D-aminoácido, 363, 364, 372
Decanóico, 18, 59
2,4-Decadienal, 45, 47, 48, 106
2,4,7-Decatrienal, 46, 47, 48, 107
2-Decenal, 44, 47
Degomagem, 74, 75, 241
Deidroácido ascórbico, 71, 131, 144, 203,
267, 299, 418, 419, 420
Desnaturação, 89, 267, 311, 352, 353,
361, 370, 372, 387, 394, 426
Desodorização, 74, 75
Detectores, 504, 523, 537
Diacilglicerol, 60
Dioxietano, 374, 376
Dipolo-dipolo, 216, 225, 496
Dodecanóico, 18, 59
DNA/RNA, 179, 307, 308, 309

E

EDTA, 132, 148, 150, 151, 263, 398, 400,
402
Eláídico, 87
Eletrostática, 36, 220, 222, 223, 224, 225,
233, 245, 248, 256, 257, 297, 358,
360, 368, 528, 532
Emulsão, 60, 96, 127, 148, 150, 158, 211,
212, 213, 214, 215, 216, 217, 218,
219, 220, 221, 223, 225, 226, 228,
230, 231, 232, 233, 234, 236, 239,
240, 242, 244, 245, 246, 250, 251,
252, 253, 255, 256, 257, 258, 259,
260, 261, 262, 263, 264, 265, 269,
270, 271, 445, 446
Emulsificação, 60, 217, 218, 242, 244,
252

Emulsificantes, 211, 213, 216, 217, 218,
219, 220, 223, 226, 227, 228, 229,
230, 231, 232, 233, 234, 240, 241,
242, 244, 245, 246, 250, 251, 252,
253, 254, 255, 256, 257, 258, 260,
264, 265, 267, 268, 269, 447
Epicatequina-3-galato, 173
Epigalo-catequina-3-galato, 174
Epóxido, 72, 73, 294, 305, 306, 307, 308,
309, 327
Equol, 473, 474
Eritorbatos, 131, 395, 400
Escurecimento, 78, 85, 99, 104, 149, 151,
329, 330, 332, 352, 353, 380, 389,
391, 393, 394, 395, 396, 397, 398,
399, 400, 401, 402, 403, 405, 406,
407, 411, 413, 414, 415, 416, 417,
418, 419, 420, 421, 423, 424, 426,
434, 455, 456, 457
Esfingolipídios, 15, 74
Esqualeno, 198
Estaquiose, 295, 296, 483
Esterificação, 233, 237, 238, 240
Esterilização, 25, 61, 317, 322, 326, 328,
363, 459
Estradiol, 465, 469, 471, 472, 475, 477
Estrogênios, 200, 471
Etano, 154
Etanol, 154, 155, 156, 157, 164, 242, 244,
274, 300, 314, 368, 446, 462, 484,
489, 514, 515, 537, 540, 550, 574
Eugenol, 274, 280

F

FADH₂, 168, 170
Fase estacionária, 462, 492, 493, 494,
495, 496, 497, 499, 500, 502, 503,
517, 522, 526, 528, 529, 530, 531,
532, 533, 534, 535, 543, 547, 573,
575, 577
Fase líquida, 494, 495, 497, 502, 528,
529, 530, 531, 538, 549, 558
Fase móvel, 155, 300, 315, 462, 484, 485,
492, 493, 494, 499, 500, 522, 523,

524, 525, 526, 528, 529, 530, 531,
533, 534, 535, 536, 538, 540, 541,
543, 544, 580
Fase normal, 525, 526, 537
Fase reversa, 483, 484, 485, 525, 530,
531, 532, 536, 542, 543
Fenilalamina, 173, 347 348
Fenoxil, 129, 130, 131, 153
Ferro, 24, 25, 41, 42, 56, 84, 90, 91, 95,
132, 137, 142, 143, 148, 151, 164,
166, 171, 179, 181, 182, 184, 187,
263, 298, 337, 398, 404, 418, 449,
456, 479
Ferrocianato de potássio, 404
Flatulentos, 295, 483
Flavonas, 454
Flavonóides, 143 171, 188, 391, 421, 459,
464, 465, 466, 467, 469, 479
Flavor requegado (WOF), 90, 91, 142
Floroglucinol, 106
Fluido supercrítico, 554, 559, 560, 561,
562, 563, 565
Folin-ciocalteu, 208, 209
Formaldeído, 327, 340, 342, 343, 353
Formononetina, 467, 474, 481
Fosfatidil etanolamina, 96
Fosfolipase, 244, 517
Fosfolipídios, 15, 16, 26, 52, 74, 75, 88,
90, 91, 93, 97, 100, 142, 143, 170,
177, 179, 183, 193, 194, 195, 197,
213, 217, 218, 232, 241, 242, 243,
251, 258, 265, 271, 381
Fotoxidação, 27, 34, 37, 38, 201
Fritura, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84,
85, 137, 153, 293, 301, 397, 398, 423
Fumaça, 78, 80, 84, 108, 118, 294, 322,
327, 330, 353
Furfural, 418, 419, 422

G

Galato de propila, 135, 137, 140
Gengibre, 274, 280, 283
Genisteína, 465, 466, 467, 469, 471, 472,
473, 474, 475, 476, 477, 478, 481, 486
Gliadinas, 266, 267

Glicerol, 15, 17, 43, 60, 80, 85, 111, 152,
227, 229, 232, 234, 235, 238, 273, 517
Glicina, 175, 305, 349
Gliciteína, 465, 466, 467, 471, 483, 486
Glicoalcalóides, 291, 292, 293, 301, 397,
542
Glicoalcalóides, 291
Glicolipídios, 15, 16, 52, 74, 98, 232
Glicosilamina, 415, 417
Glicosinolatos, 290, 291
Globina, 42, 334
Globulina, 252, 266, 383, 384, 477
Glutamato, 175, 432
Glutamina, 350, 352
Glutathione, 164, 166, 168, 169, 170, 171,
175, 181, 182, 183, 187, 188, 189,
191, 264, 305, 307, 403, 407, 478
Glutathione peroxidase, 166, 168
Glutathione reductase, 166, 168, 187
Glúten, 51, 57, 236, 266, 267, 372, 407
Gluteninas, 266, 267
Goitrogênico, 289, 291
Goma arábica, 223, 246, 247, 253, 256
Goma guar, 254
Gomas, 75, 213
Guaiacol, 436, 437, 439

H

HDL, 88, 194, 196, 197, 476
Heme, 26, 28, 41, 42, 52, 89, 93, 168,
169, 181, 334, 408, 436, 437, 444
Hemoglobina, 26, 41, 42, 166, 168, 169
2,4-Heptadienal, 45, 47, 107
Hexanal, 47, 48, 49, 59, 90, 106, 107,
202, 204, 278
Hexanol, 53
2-Hexenal, 47, 53, 56
2-Hexenol, 53
3-Hexenal, 46, 47, 107
3-Hexenol, 53
Hidrocarbonetos, 16, 27, 28, 40, 49, 62,
68, 75, 79, 86, 101, 195, 215, 256,
260, 273, 276, 277, 293, 294, 428,
496, 498, 525, 551, 576

Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, 286, 293
Hidrogenação, 17, 74, 78, 85, 86, 87, 88, 193, 194
Hidroperoxil, 62, 64, 66
Hidroxil, 40, 49, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 80, 153, 171, 177, 179, 182, 183, 184, 185, 186, 190, 209, 259, 309, 374, 376, 377, 478
Hidroxitirosol, 153, 154
Hidroximetilfurfural (HMF), 415, 422
Hipoclorito de sódio, 311, 402
Hipoxantina, 64
Histidina, 42, 85, 248, 307, 338, 350, 359, 365, 376, 414, 415, 427
HMG-COA, 198, 208

I

Índice de iodo, 20, 21, 79, 115, 117
Índice de peróxido, 39, 79, 84, 117
Índice de refração, 86, 538
Índice de saponificação, 20, 21 111, 112, 113, 230
Íon nitrosônio, 335
Íon superóxido, 164, 165, 167, 183, 186, 203
Íon-dipolo, 216
Íon-íons, 222
Isoascorbato, 337
Isobetanina, 469
Isoflavonóides, 171, 174, 465, 468, 470, 474, 476, 477, 478, 480, 481, 482, 483, 484, 487
Isomerase, 53

L

Lactoalbumina, 383, 884
Lactose, 96, 295, 417, 423
Lantionina, 365, 366
LDL, 88, 161, 171, 179, 180, 194, 195, 196, 197, 200, 202, 203, 204, 476, 478
Lecitina, 148, 219, 232, 241, 242, 243, 244, 268, 271, 517

Liase, 53, 54, 289
Limiar de percepção, 43, 59
Limoneno, 274, 277, 278, 280, 551, 576
Linamarina, 288, 289
Linoléico, 19, 20, 21, 24, 25, 28, 30, 31, 32, 38, 43, 45, 49, 51, 52, 54, 57, 66, 67, 68, 86, 88, 90, 94, 105, 107, 119, 125, 157, 158, 159, 179, 192, 193, 194, 424, 428, 517, 577
Linolênico, 19, 24, 25, 28, 33, 39, 43, 45, 51, 52, 66, 68, 84, 94, 105, 107, 125, 170, 424, 517
Lipases, 26, 52, 53, 57, 60, 126, 214, 370, 371
Lipoproteínas, 15, 90, 162, 163, 170, 171, 179, 180, 195, 196, 197, 202, 203, 204, 258, 265, 379
Lipoxigenase, 24, 25, 28, 29, 42, 50, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 97, 110, 126, 162, 166, 183, 318, 320, 329, 330, 396, 397, 399, 401, 438, 483
Lisina, 85, 248, 311, 350, 352, 359, 365, 366, 371, 372, 380, 390, 414, 415, 417, 423, 424, 425, 427, 434
Lisinoalanina (Lal), 365, 367
Locusta, 254
Luz UV, 27, 34, 65, 130, 205, 215, 283, 300, 315, 484

M

Maillard, 85, 148, 221, 372, 398, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 424, 428, 434, 444
Malonaldeído, 117, 118, 119, 120, 121, 163, 202
Malonildaidzina, 467
Malonilgenistina, 468
Malonilglicitina, 467
Melanina, 389, 391, 394
Melanoidina, 413, 418
Mentol, 280
Mentona, 280
Metais, 22, 24, 25, 30, 31, 36, 40, 41, 65, 74, 75, 80, 96, 98, 99, 127, 128, 132, 138, 147, 148, 151, 153, 164, 166,

171, 179, 185, 186, 187, 202, 203,
259, 261, 262, 263, 264, 265, 271,
324, 368, 415, 421, 444, 449, 453,
456, 478, 479, 551
Metaloproteínas, 24, 25, 28, 91, 142
Metamioglobina, 42
Metilcatecol, 411
Metionina, 85, 307, 311, 352, 380, 390,
427
Mioglobina, 27, 34, 37, 41, 42, 90, 91,
142, 334, 337, 338
Monoacilglicerol, 80, 217
Monoestearato de glicerol, 227, 229
Monoglicerídio, 79, 113, 145, 213, 234,
235, 236, 237, 240, 268, 267, 269
Monooleato de polioxietileno sorbitana,
227, 229, 230
Monóxido de nitrogênio, 42, 337, 338
NADPH oxidase, 64

N

NAD/NADH, 170, 190
Niacina, 170, 328
Níquel, 86, 88, 148
Nitrato/nitrito, 322,
Nitrosaminas, 286, 336, 337, 338, 340,
406
Nitrosomioglobina, 406, 407
Nonanal, 47, 107
2-Nonenal, 48, 53
3-Nonenal, 48, 55
3-Nonenol, 53
2,6-Nonadienal, 53, 56
Norbixina, 445

O

2,5-Octadienal, 47, 107
2-Octenal, 48, 106, 107
Octanal, 47, 106, 107, 277, 278
Octanóico, 18, 59
Oléico, 18, 24, 30, 31, 38, 43, 44, 52, 66,
68, 83, 86, 87, 88, 94, 105, 107, 109,
110, 230, 425, 517

Ornitinoalanina, 365, 366
Oxálico, 71, 427
Oxidase de função mista, 307
Óxido de etileno, 230, 236, 240, 245, 327,
328, 329
Óxido de propileno, 328
Óxido nítrico, 164, 165, 166, 167, 169,
200, 334, 338, 406
Oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), 35, 62, 63, 65,
68, 70, 72, 73, 177, 192, 201, 435
Oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$), 29, 34, 36, 64,
128, 178, 201
Oxi-hemoglobina, 41, 169
Ozônio, 22, 62

P

Palmitato de ascorbila, 131, 139, 141,
145, 146
Paraben, 271, 321, 323
Pasteurização, 25, 95, 96, 299, 317, 319,
320, 322, 353, 363, 394, 455, 459
Pectinaesterase, 318, 319
2-Penteno, 50
2-Pentenol, 50
Período de indução, 34, 39
Peroxidase, 164, 168, 170, 171, 176, 180,
181, 182, 183, 184, 187, 188, 191,
318, 320, 376, 399, 401, 408, 419,
435, 436, 437, 438, 440, 441, 442
Peroxidienona, 72, 129
Peróxido, 22, 25, 27, 28, 30, 31, 34, 35,
36, 37, 39, 40, 41, 43, 52, 54, 56, 57,
59, 62, 64, 65, 66, 67, 80, 81, 82, 83,
84, 91, 96, 101, 102, 104, 105, 118,
119, 142, 165, 166, 167, 170, 177,
178, 179, 180, 181, 182, 183, 185,
187, 188, 200, 202, 259, 374, 376,
379, 380, 420, 436, 438, 478
Peróxido de hidrogênio, 66, 185
Peróxil, 27, 30, 40, 41, 52, 57, 62, 64, 65,
66, 67, 68, 69, 71, 72, 128, 129, 130,
141, 166, 167, 170, 175, 178, 179,
187, 188, 190, 201, 202, 203, 215,
259, 262, 374, 378, 490
Peroxinitrito, 165, 166, 167, 175, 189

P-etil fenol, 474
Pigmentos, 16, 22, 26, 35, 36, 37, 52, 57,
65, 74, 75, 76, 100, 186, 274, 329,
332, 389, 394, 396, 397, 401, 407,
413, 418, 426, 431, 444, 447, 449,
452, 456, 458, 531, 555.
Poliacrilato, 547, 548
Polidimetilsiloxano (pdms), 548
Polifenóis, 25, 127, 166, 168, 172, 174,
188, 201, 372, 389, 401, 425, 475
Polifenol oxidase, 174, 318, 389, 391,
392, 394, 397
Polifosfatos, 148, 149, 150, 263, 358
Poligalacturonase, 318, 320
Polímeros, 75, 76, 78, 79, 81, 82, 83, 85,
161, 245, 246, 252, 266, 318, 345,
359, 387, 457, 458
Polissacarídeos, 186, 216, 217, 218, 219,
221, 223, 245, 246, 247, 248, 253,
256, 264, 422, 424, 426, 428
Pontes de enxofre, 51, 182, 249, 255, 266,
349, 350, 365
Pontes de hidrogênio, 153, 215, 217, 225,
248, 266, 297, 349, 350, 355, 370,
379, 381, 387, 454, 528
Ponto crítico, 554, 557, 558, 559, 560
Ponto de fumaça, 78, 108
Ponto isoelétrico (pi), 354
Potencial de redução, 63, 66, 67, 68, 69,
70, 71, 73, 374, 376
Pratos teóricos, 499, 500, 516
Propanal, 47, 107
Propano, 556
Propil galato, 131
Propileno glicol, 152
Propionato, 321, 325
Proteases, 287, 288, 364, 367, 370, 371

Q

Quercitina, 174
Quimotripsina, 249, 287, 370
Quinona, 71, 72, 128, 141, 190, 389, 390,
392, 394, 396, 400, 401, 403, 407

R

Radical alcóxil, 43, 63, 65, 68
Radical hidroxil, 40, 62, 63, 65, 67, 68,
69, 71, 177, 184, 374
Radical livre, 22, 27, 28, 29, 30, 31, 35,
40, 54, 67, 128, 129, 164, 166, 167,
170, 176, 177, 178, 184, 187, 201, 215
Radical peróxil, 27, 57, 63, 64, 66, 67, 69,
71, 129, 141, 187
Rafinose, 295, 296, 483
Resorcinol, 393
Resveratrol, 204
Riboflavina, 27, 34, 36, 37, 65, 70, 170,
182, 311, 328, 483
Ricinoléico, 21

S

Sacarose, 232, 239, 264, 422, 424, 428,
429, 432, 457
Salting-in, 358
Salting-out, 546
Selênio, 166, 171, 182, 183, 201, 306, 478
Sesquiterpeno, 280
Sinergismo, 132, 133, 135, 136, 137
Solanaína, 292, 293
Sorbato de potássio, 321, 406
Sorbitol, 232, 240
Split/splitless, 547
Sulfidril, 59, 175, 249, 267, 328, 349
Sulfito, 131, 147, 151, 322, 329, 330,
331, 332, 333, 342, 343, 394, 395,
396, 397, 398, 399, 400, 401, 402,
403, 405, 411, 416, 420, 438, 455,
457, 458
Superóxido dismutase, 164, 165, 166, 167,
168, 169, 170, 171, 180, 181, 183,
184, 185, 186, 204, 435, 478

T

Tanino, 355, 356
TBA, 117, 118, 119, 120, 121, 143

TBHQ, 84, 127, 128, 134, 135, 137, 138, 141, 152
Terpenos, 188, 273, 274, 276, 277, 280, 464, 551, 576
Testosterona, 477
Tetraquaiacol, 437
Tiocianato, 289, 291
Tióis, 57, 85, 176, 394, 408
Tirosina, 350, 352, 376, 390, 391, 396, 397, 469, 475, 476, 477
Tirosina quinase, 469
Tocoferóis, 34, 65, 71, 76, 91, 127, 128, 134, 137, 139, 140, 141, 143, 144, 145, 146, 171, 187, 189, 190, 202, 398, 513, 555, 571, 574
Tocotrienóis, 171, 425
Topoisomerase, 469, 477
Treônico, 71
Trigonelina, 425, 427, 429, 431
Tripentiltroxano, 49
Tripsina, 249, 287, 365, 370, 483
Triptofano, 338, 350, 352, 376, 380, 414

U

2-Undecenal, 47, 106
Urucum, 444, 445, 446, 447

V

Valenceno, 278, 279
Vermelho sudan III, 270
Viscosidade, 76, 77, 79, 81, 218, 253, 254, 256, 264, 269, 352, 524, 535, 554, 558, 559, 563
Vitamina C, 168, 170, 180, 478
Vitamina D, 73
Vitamina E, 139, 166, 168, 180, 183, 188, 190
VLDL, 196, 197, 476

X

Xantina, 64, 166
Xantina oxidase, 167

Z

Zinco, 151, 166, 169, 171, 172, 297, 298, 456
Zwiteriônico, 219